



**Rita João Louro  
Guerreiro**

**Biomarcadores no Defeito Cognitivo Ligeiro e na  
Doença de Alzheimer**



**Rita João Louro  
Guerreiro**

**Biomarcadores no Defeito Cognitivo Ligeiro e na  
Doença de Alzheimer**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica da Dra. Catarina Resende Oliveira, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Dra. Odete Cruz e Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## palavras-chave

Doença de Alzheimer, Defeito Cognitivo Ligeiro, Neuroinflamação, Genética, Stresse Oxidativo.

## resumo

A doença de Alzheimer é a forma de demência mais comum no idoso, afectando cerca de 10% dos indivíduos com 65 anos. Considera-se que tenha uma origem multifactorial, sendo vários os factores que contribuem para a formação das placas senis, bem como das tranças neurofibrilares, características desta patologia. O diagnóstico baseia-se no exame clínico, testes neuropsicológicos e técnicas de imagiologia cerebral, sendo feito por exclusão de outras formas de demência de causa conhecida. O defeito cognitivo ligeiro (DCL) caracteriza-se pela ocorrência de défices cognitivos subtis mantendo-se, de uma forma geral, intactas a cognição e a realização de actividades da vida quotidiana. A identificação de um biomarcador seria útil não só para o diagnóstico destas patologias, mas também para o início e monitorização de uma terapêutica neuroprotectora, para o acompanhamento da progressão da doença e para a avaliação da população em risco para a doença. Assim, pretendeu-se com este trabalho identificar parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e níveis de expressão de proteínas envolvidas na morte celular, a nível do sangue periférico, que permitissem diferenciar indivíduos cognitivamente saudáveis de indivíduos com doença de Alzheimer ligeira e DCL. Analisaram-se também polimorfismos genéticos na tentativa de identificar, não só marcadores entre grupos, como indicadores de susceptibilidade para a doença. Pretendeu-se também encontrar preditores de prognóstico da conversão do estadio de DCL para doença de Alzheimer, tendo para isso sido realizado um estudo longitudinal.

Os resultados obtidos sugerem que na doença de Alzheimer existe um aumento da percentagem de monócitos a produzir citocinas pró-inflamatórias, o que poderá traduzir um estado inflamatório persistente nesta patologia. Neste contexto, os monócitos, mas não os linfócitos, poderão ser considerados bons alvos de estudo para o controlo da evolução de DCL para doença de Alzheimer. Os parâmetros de stresse oxidativo estudados revelaram um decréscimo das defesas antioxidantes nos grupos de doentes com uma activação evidente do ciclo do glutationa nestas doenças e um aumento significativo nos níveis de metabolitos do monóxido de azoto. Os polimorfismos genéticos estudados não revelaram diferenças significativas entre grupos, à excepção do genótipo da apolipoproteína E.

Relativamente à totalidade dos parâmetros avaliados, o grupo DCL apresentou valores intermédios entre o grupo controlo e o grupo de doentes de Alzheimer, o que confirma que esta fase se situa entre o envelhecimento normal e a demência. A confirmação destes resultados, englobando um maior número de indivíduos e o seu acompanhamento ao longo do tempo por um período previsível de cinco anos, abrem novas perspectivas na identificação de biomarcadores da doença, que poderão ser úteis no diagnóstico e prevenção da demência de Alzheimer.

## **keywords**

Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, Neuroinflammation, Genetics, Oxidative Stress.

## **abstract**

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly, affecting about 10% of individuals with 65 years of age, and doubling its incidence for every 5 years. AD is thought to be a multifactorial disease, with several factors contributing to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles, pathological hallmarks of the disease. Diagnosis is performed by clinical examination, neuropsychological tests and brain imaging, ultimately diagnosis is made by exclusion of other known forms of dementia. Mild Cognitive Impairment (MCI) is characterized by the occurrence of subtle cognitive impairments, generally keeping intact cognition and ordinary daily activities. Identification of a biomarker would be useful in order to allow the beginning of neuroprotective therapy as early as possible, to monitor this treatment, to relate to the progression of the disease and to identify individuals who are at risk to develop the disease.

The aim of this work was to identify peripheral markers of inflammation, oxidative stress and expression levels of cell death related proteins, in order to distinguish between AD, MCI and healthy individuals. Furthermore, genetic polymorphisms were also analysed in the attempt not only to identify genetic differences between these groups, but also to identify markers of susceptibility to the disease. In addition, we also intended to find markers of conversion from an MCI condition to AD, and in order to achieve this goal, we performed a longitudinal study.

Our results suggest that in AD there's an increase in the percentage of monocytes producing pro-inflammatory cytokines, what is in accordance with a persistent inflammatory state in this pathology. Being so, monocytes, but not lymphocytes, may be considered as good biological targets in the control of the evolution from MCI to AD. Oxidative stress results showed a decrease of antioxidant defenses in our patients groups, with a clear activation of the glutathione cycle, additionally we also found a significant increase in the levels of nitric oxide metabolites in these groups. Genetic polymorphisms screened showed no differences between groups, with the exception of ApoE genotype, as previously described. When analysing all the results from this work, it is clear that MCI's are in between the ones from AD and the ones from healthy controls, clearly showing that this condition is probably a transition phase between healthy aging and dementia. Confirmation of these results, using a larger sample series and with a duration of approximately 5 years, will probably allow the identification of suitable biomarkers, that may be of extreme importance in diagnosis and prevention of AD.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	8
ÍNDICE DE TABELAS .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
INTRODUÇÃO .....	14
1. Conceitos de demência e de doença de Alzheimer (DA) .....	14
2. Conceito de Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) .....	21
3. Processos metabólicos que levam à morte celular na DA e DCL.....	25
OBJECTIVOS DO ESTUDO .....	51
Especificação dos objectivos do estudo: .....	51
DESENHO DO ESTUDO .....	52
1. Estudo dos parâmetros de stresse oxidativo, inflamatórios e de morte celular .....	52
2. Estudo genético .....	52
METODOLOGIA.....	53
1. População em estudo.....	53
2. Colheita e preparação do material biológico .....	56
3. Parâmetros de stresse oxidativo.....	59
4. Citometria de fluxo.....	67
5. Estudo genético .....	79
6. Análise estatística.....	88
RESULTADOS .....	89
1. Caracterização da população .....	89
2. Parâmetros inflamatórios.....	91
3. Parâmetros de morte celular.....	118
4. Estudo genético .....	135
5. Parâmetros de stresse oxidativo.....	145
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	151

<i>Considerações às metodologias utilizadas.....</i>	<i>152</i>
<i>Parâmetros inflamatórios.....</i>	<i>156</i>
<i>Expressão de proteínas de morte celular.....</i>	<i>164</i>
<i>Parâmetros de stresse oxidativo.....</i>	<i>168</i>
<i>Estudo genético.....</i>	<i>178</i>
<i>Conclusões gerais.....</i>	<i>184</i>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>187</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I- Critérios clínicos de diagnóstico da doença de Alzheimer. ....	15
Tabela II- Características demográficas dos indivíduos envolvidos no estudo dos parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de morte celular. ....	54
Tabela III- Características demográficas dos indivíduos envolvidos no estudo genético. ....	54
Tabela IV- Combinações <i>primers</i> /sondas utilizadas para determinação dos genótipos das várias citocinas em estudo. ....	83
Tabela V- Características dos ensaios utilizados para a determinação dos genótipos por PCR-RFLP das citocinas em estudo. ....	86
Tabela VI – Sequências oligonucleotídicas 5'→3' utilizadas como <i>primers</i> para a determinação do genótipo APOE. ....	87
Tabela VII- Caracterização de cada um dos grupos estudados, atendendo aos seguintes parâmetros: idades, idades de início, <i>score</i> MMSE, ADAS-cognitivo e anos de escolaridade. ....	89
Tabela VIII- Características dos vários grupos estudados geneticamente. ....	90
Tabela IX- Percentagem de monócitos produtores de citocinas e quantidades de citocinas produzidas nos três grupos estudados. ....	92
Tabela X- Diferenças entre as médias (percentagens e MIFs) obtidas para os ensaios com activação e os ensaios sem activação. ....	93
Tabela XI- Correlações entre idades de início da doença dos indivíduos dos grupos DCL e DA e os parâmetros inflamatórios determinados em monócitos. ....	102
Tabela XII- Análise das populações linfocitárias relativamente à produção de TNF- $\alpha$ , nos três grupos em estudo. ....	103
Tabela XIII- Percentagem média de monócitos produtores das citocinas em estudo e quantidades relativas de cada citocina, no grupo DCL, relativas à segunda avaliação. ....	108
Tabela XIV- Análise das populações linfocitárias no grupo DCL, relativa à segunda avaliação. ....	109
Tabela XV- Percentagem média de monócitos produtores das citocinas em estudo e quantidades relativas de cada citocina, no grupo DCL, relativas à terceira avaliação. ....	111
Tabela XVI- Análise das populações linfocitárias no grupo DCL, relativa à terceira avaliação. ....	112
Tabela XVII- Expressão das proteínas Bax e Bcl2 nos três grupos em estudo. ....	118
Tabela XVIII- Percentagem dos subtipos de linfócitos que expressam Fas e FasL em DA, DCL e controlos. ....	122
Tabela XIX- Análise da expressão das proteínas Bax e Bcl2, relativa à segunda avaliação. ....	125
Tabela XX- Análise da expressão das proteínas Fas e FasL, relativa à segunda avaliação. ....	126
Tabela XXI- Análise da expressão das proteínas Bax e Bcl2, relativa à terceira avaliação. ....	127
Tabela XXII- Análise da expressão das proteínas Fas e FasL, relativa à terceira avaliação. ....	128
Tabela XXIII- Genotipagem do polimorfismo rs1799724 do gene TNFA nos grupos em estudo. ....	135

Tabela XXIV- Genotipagem do polimorfismo rs1800629 do gene TNFA nos grupos em estudo.....	136
Tabela XXV- Genotipagem do polimorfismo rs361525 do gene TNFA nos grupos em estudo .....	137
Tabela XXVI- Genotipagem do polimorfismo rs1800795 do gene IL6 nos grupos em estudo .....	138
Tabela XXVII- Genotipagem do polimorfismo rs1800796 do gene IL6 nos grupos em estudo.....	139
Tabela XXVIII- Genotipagem do polimorfismo rs1143634 do gene IL1B nos grupos em estudo.....	140
Tabela XXIX- Genotipagem do polimorfismo rs3087258 do gene IL1B nos grupos em estudo.....	141
Tabela XXX- Genotipagem do polimorfismo rs3212227 do gene IL12 nos grupos em estudo.....	143
Tabela XXXI- Genotipagem da APOE nos grupos em estudo.....	144
Tabela XXXII- Níveis de antioxidantes não enzimáticos obtidos nos três grupos em estudo. ....	146
Tabela XXXIII- Níveis de marcadores de oxidação obtidos para os três grupos em estudo.....	149



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Processo proteolítico da proteína precursora amiloide (APP).....	18
FIGURA 2. Modelo da progressão do defeito cognitivo ligeiro. ....	22
FIGURA 3. Células capazes de produção e de resposta à IL-12.....	32
FIGURA 4. A ligação do FasL ao Fas inicia o processo apoptótico. ....	35
FIGURA 5. Modelos das vias intracelulares que levam à apoptose.....	38
FIGURA 6. Esquema do funcionamento dos citômetros de fluxo. ....	68
FIGURA 7. Layout óptico dos citômetros de fluxo FACScalibur. ....	69
FIGURA 8. Esquema representativo do processo geral de análise citofluorimétrica. ....	70
FIGURA 9. Desenho do ensaio para discriminação alélica utilizando sondas fluorogénicas..	79
FIGURA 10. Diagrama de uma sonda fluorogénica TaqMan® MGB.....	81
FIGURA 11. Esquema dos resultados possíveis da genotipagem da ApoE.....	87
FIGURA 12. Identificação dos monócitos do sangue periférico.....	91
FIGURA 13. Médias da percentagem de monócitos periféricos em cada um dos grupos estudados. ....	93
FIGURA 14. Média da percentagem de monócitos produtores de TNF- $\alpha$ .....	94
FIGURA 15. Média da percentagem de monócitos produtores de IL-6.....	95
FIGURA 16. Média da percentagem de monócitos produtores de IL-12.....	96
FIGURA 17. Média da percentagem de monócitos produtores de IL-1 $\beta$ .....	97
FIGURA 18. Correlação entre as idades e os parâmetros relativos ao TNF- $\alpha$ .....	99
FIGURA 19. Correlação entre as idades e os parâmetros relativos à IL-6.....	100
FIGURA 20. Correlação entre as idades e os parâmetros relativos à IL-12.....	101
FIGURA 21. Correlação entre os valores da escala MMSE e a percentagem de monócitos. ....	102
FIGURA 22. Comparação das médias das percentagens de linfócitos.....	104
FIGURA 23. Comparação das médias das percentagens dos vários tipos de linfócitos.....	105
FIGURA 24. Comparação das médias associadas aos subtipos linfocitários produtores de TNF- $\alpha$ . ....	106
FIGURA 25. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos monócitos produtores de TNF- $\alpha$ . ....	114
FIGURA 26. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos monócitos produtores de IL-6. ....	114
FIGURA 27. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos monócitos produtores de IL-12. ....	115
FIGURA 28. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos monócitos produtores de IL-1 $\beta$ . ....	115
FIGURA 29. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à percentagem dos tipos de linfócitos estudados. ....	116
FIGURA 30. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à produção de TNF- $\alpha$ pelos tipos linfocitários estudados. ....	117
FIGURA 31. Comparação das médias das percentagens de granulócitos, monócitos e linfócitos entre os grupos controlo, DCL e DA. ....	119
FIGURA 32. Comparação das médias das percentagens de cada subtipo linfocitário estudado.....	120

FIGURA 33. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos B. ....	120
FIGURA 34. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos T. ....	121
FIGURA 35. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos NK. ....	121
FIGURA 36. Comparação dos subtipos linfocitários que expressam FasL. ....	123
FIGURA 37. Comparação dos subtipos linfocitários que expressam a proteína Fas. ....	124
FIGURA 38. Percentagem dos vários subtipos linfocitários estudados no grupo DCL ao longo do tempo. ....	129
FIGURA 39. Expressão de Bcl2 e Bax por granulócitos no grupo DCL ao longo do tempo. ....	130
FIGURA 40. Expressão de Bcl2 e Bax por monócitos no grupo DCL ao longo do tempo. ....	130
FIGURA 41. Expressão de Bcl2 e Bax expressas por linfócitos B no grupo DCL ao longo do tempo. ....	130
FIGURA 42. Expressão de Bcl2 e Bax por linfócitos T no grupo DCL ao longo do tempo. ....	131
FIGURA 43. Expressão de Bcl2 e Bax por linfócitos NK no grupo DCL ao longo do tempo. ....	131
FIGURA 44. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos linfócitos B que expressam FasL e FAS. ....	132
FIGURA 45. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos linfócitos T que expressam FasL e FAS. ....	133
FIGURA 46. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos aos linfócitos NK que expressam FasL e FAS. ....	134
FIGURA 47. Comparação da sobrevivência cumulativa sem doença entre os três genótipos possíveis para o polimorfismo -511 do gene IL1B no grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença depois dos 65 anos e história familiar negativa. ....	142
FIGURA 48. Níveis plasmáticos de vitamina E e de GSH e níveis eritrocitários de GSH e da razão entre GSH e GSSG. ....	147
FIGURA 49. Níveis médios de actividade das enzimas GIPx e GRed. ....	148
FIGURA 50. Níveis médios plasmáticos de MDA, grupos carbonilo, NO2 e NO3. ....	150
FIGURA 51. Níveis eritrocitários de MDA. ....	150
FIGURA 52. Ciclização do glutatião reduzido (GSH) e oxidado (GSSG). ....	171
FIGURA 53. Dano neuronal resultante da geração de NO e ONOO <sup>-</sup> pelos astrócitos, após exposição destes a citocinas. ....	176
FIGURA 54. Diferentes mecanismos patogénicos que contribuem para a morte celular na doença de Alzheimer. ....	185

## INTRODUÇÃO

### ***1. Conceitos de demência e de doença de Alzheimer (DA)***

A demência é essencialmente uma doença do envelhecimento. Na escala DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994), a demência é caracterizada por múltiplos defeitos cognitivos que incluem defeitos na memória, linguagem, aprendizagem, orientação e concentração, inteligência geral, resolução de problemas, percepção e julgamento. A personalidade dos indivíduos demenciados pode sofrer alterações. As funcionalidades do dia-a-dia e sociais são significativamente afectadas não existindo qualquer defeito na consciência [1]. A forma mais comum de demência é a doença de Alzheimer, seguida da demência vascular. Outras causas comuns de demências incluem a doença de Parkinson, a demência com corpos de Lewy, a doença de Huntington, etc.

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, que afecta cerca de 5-10% da população com mais de 65 anos de idade, duplicando a sua incidência a cada 5 anos. Em média, na Europa e na América do Norte, dois em cada três doentes que apresentam demência são diagnosticados com doença de Alzheimer [2, 3].

Clinicamente caracteriza-se por um início insidioso, um declínio cognitivo global, incluindo defeitos a nível da memória, orientação e funcionamento intelectual, conduzindo eventualmente à morte. Estas características tornam a DA uma doença extremamente debilitante, não só para os doentes, como para os seus cuidadores.

#### **1.1. Diagnóstico da doença de Alzheimer**

Nos últimos anos foram desenvolvidos critérios de diagnóstico standardizados para a DA (Tabela I), juntamente com *guidelines* para a sua utilização, o que levou a um aumento da confiança no diagnóstico clínico desta doença.

Tabela I- Critérios clínicos de diagnóstico da doença de Alzheimer.

Abreviatura	Título	Fonte
NINCDS/ ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria</i>	McKhann et al, 1984
ICD - 10	<i>International Classification of Mental and Behavioural Disorders, In: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th edition</i>	World Health Organization, Geneve, 1993
DSM - IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 4th Edition</i>	American Psychiatric Association, 1994

O diagnóstico clínico é normalmente feito pelos critérios do *National Institute of Neurological Disorders and Communicative Disorders – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) e pelos critérios do *Diagnostic and Statistical Manual, 4<sup>th</sup> edition* (DSM-IV) (*American Psychiatric Association*, 1994) [1, 4]. Segundo os critérios NINCDS-ADRDA, o diagnóstico de DA é dividido em possível, provável e definitivo. Os critérios para DA provável têm uma boa correspondência com o diagnóstico patológico e, em geral, sobrepõem-se aos critérios DSM-IV e ICD-10 [5]. Nos critérios NINCDS-ADRDA o diagnóstico clínico é considerado possível ou provável e o diagnóstico patológico é tido como definitivo.

Patologicamente, a DA caracteriza-se por perdas neuronais e sinápticas, placas senis e tranças neurofibrilares, as quais aparecem inicialmente na região transtorrinal, espalham-se para as estruturas límbicas e finalmente para as áreas neocorticais [6, 7].

O diagnóstico patológico da DA baseia-se principalmente nos critérios do *National Institute on Aging and the American Association of Retired Persons* (NIA/AARP) ou *Khachaturian criteria* e *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease* (CERAD), os quais utilizam pontuações de placas senis relacionadas com a idade para estabelecer um diagnóstico neuropatológico [8]. O consenso dos *National Institute on Aging/Reagan Institute Working Group*, as chamadas recomendações NIA/Reagan Institute, têm em conta o número de placas e de tranças no neocortex e nas regiões límbica e paralímbica [9].

## 1.2. Alterações nas funções cognitivas na DA

O curso clínico da DA envolve tipicamente um início gradual e uma progressão lenta, sendo caracterizado por defeitos numa larga gama de funções cognitivas. A disfunção a nível da memória é frequentemente a manifestação inicial. Nestes doentes, tanto a memória a curto prazo como a memória a longo prazo são progressivamente afectadas. A memória episódica a longo prazo é afectada mais cedo no processo de desenvolvimento da doença, enquanto a memória semântica é, normalmente, afectada mais tardiamente [10].

Um distúrbio na *performance* a nível da atenção está sempre presente e um metabolismo cerebral reduzido é associado com um tempo de reacção mais lento especialmente em testes de atenção dividida [11].

A taxa de declínio nas funções de linguagem é mais rápida num processo de demência com um maior envolvimento do hemisfério esquerdo [12]. Um acontecimento inicial é a perda de fluência verbal por categorias, por exemplo, nomes de animais, ou palavras começadas por determinada letra. À medida que a demência progride, muitos doentes tornam-se disfágicos. Num estadio mais tardio, a linguagem torna-se completamente não fluente, a repetição é claramente afectada e o discurso deteriora-se até uma total afasia [13].

Os defeitos a nível visuo-espacial estão já presentes na DA ligeira, quando a doença progride com maior envolvimento do hemisfério direito [12, 14]. Estes defeitos resultam em sintomas como a colocação de objectos nos locais errados, ou a desorientação e dificuldade em tarefas como desenhar figuras complexas. Dificuldades nos cálculos, apraxia e agnosia são outros problemas que se desenvolvem com a DA.

Os sintomas psiquiátricos ou de comportamento são as maiores fontes de stresse para o doente e cuidadores. Em cerca de 25% dos doentes ocorrem sintomas de depressão, apesar da depressão profunda não ser comum [15]. Embora raramente sistematizada, a ocorrência de alucinações é também bastante comum. A ocorrência de sintomas afectivos e psicóticos pode exacerbar a incapacidade do doente e conduzir a uma institucionalização precoce. O espectro de dificuldades comportamentais é vasto (agitação, agressão, insónias, baixa auto-estima, ...) e frequentemente piora com a progressão da doença.

### 1.3. Neuropatologia da doença de Alzheimer

#### 1.3.1. $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ )

A amilóide desempenha um papel fundamental na DA [16, 17]. Por definição, a alteração neuropatológica necessária para o estabelecimento do diagnóstico de DA definitiva é o número adequado de placas amilóides [8].

A amilóide é formada a partir da proteína precursora amilóide (APP), a qual é uma glicoproteína transmembranar com importantes funções no organismo, estando envolvida na sinalização celular, transporte axonal, apoptose, sobrevivência celular, entre outras [18]. A APP é produzida no SNC pelos neurónios, astrócitos, microglia, células endoteliais e células musculares lisas [19, 20]. A síntese de APP encontra-se aumentada após diferentes tipos de lesões do SNC, no entanto, a DA não está associada com uma sobre-expressão generalizada desta proteína [21, 22]. A prova mais consistente que sugere o papel essencial e inicial da amilóide na patogénese da DA é a evidência genética das famílias com mutações no gene que codifica a APP.

O processamento proteolítico da APP pode dar origem ao peptídeo  $A\beta$  e está altamente relacionado com o seu estado de fosforilação [19, 23-25]. A APP constitui uma família de oito isoformas diferentes que são produzidas por *splicing* alternativo [26]. A via de processamento constitutiva secretora resulta na clivagem no domínio  $A\beta$  da APP pela  $\alpha$ -secretase. Como resultado são obtidos dois fragmentos de diferentes dimensões. O mais reduzido denomina-se p3, enquanto o maior tem o nome de APPs. O fragmento p3 não apresenta qualquer toxicidade. Esta via previne a formação de  $A\beta$  e é considerada uma via não amiloidogénica [27, 28]. Se a APP for clivada por uma  $\beta$ -secretase, não é formado o pequeno fragmento p3, mas outro de tamanho maior (Abeta) e que apresenta toxicidade.

Foram também propostas vias alternativas de processamento/metabolismo da APP, como a via endossomal-lisossomal que consiste na reinternalização da APP da superfície celular e resulta na formação de cinco peptídeos, o maior dos quais contém o domínio  $A\beta$  inteiro e pode ser clivado para produzir  $A\beta$  [29-31].

Um dos eventos considerados centrais na DA é a alteração conformacional dos peptídeos  $A\beta$  solúveis para fibrilas amilóides insolúveis [32]. A proteína mais pequena,  $A\beta$ 1-40 deposita-se principalmente a nível das paredes dos vasos sanguíneos [33] enquanto

a A $\beta$  mais longa, A $\beta$  1-42 se encontra mais associada com as placas senis [34].

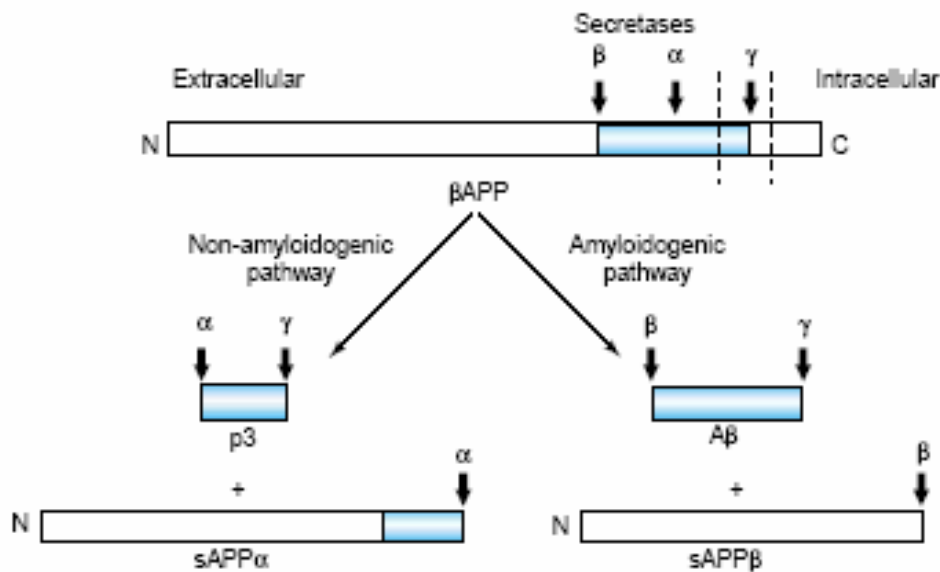


Figura 1. Processo proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) (adaptado de Scorer CA, 2001 [35]).

### 1.3.2. Tau ( $\tau$ )

Os microtúbulos são estruturas essenciais para a manutenção da estrutura e função dos neurónios. As proteínas tau ( $\tau$ ) pertencem ao grupo das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Estas associam-se com a tubulina polimerizada, alterando as propriedades dos microtúbulos e, consequentemente a forma das células.

A proteína tau pertence a uma família de polipeptídeos intimamente relacionados, com uma massa molecular entre os 50 e 85 kDa [36]. Encontram-se três isoformas diferentes:  $\tau$  citosólica normalmente fosforilada (C- $\tau$ ),  $\tau$  hiperfosforilada solúvel (HP- $\tau$ ) e  $\tau$  polimerizada em pares de filamentos helicoidais (PHF- $\tau$ ), que apresentam uma microheterogeneidade relacionada em parte com a fosforilação, uma vez que a  $\tau$  é uma fosfoproteína e o seu grau de fosforilação regula a sua actividade biológica.

Ao contrário da tau normal que contém dois ou três grupos fosfato, a HP- $\tau$  contém 5-9 mol de fosfato por mol de proteína [37]. A hiperfosforilação da  $\tau$  provoca, provavelmente, a quebra do sistema de microtúbulos nos neurónios. A HP- $\tau$  não se liga à tubulina e inibe o

agrupamento *in vitro* da  $\tau$  normal e da tubulina em microtúbulos [38]. A PHF- $\tau$  é uma característica comum nas doenças degenerativas como a DA, doença de Pick, demência fronto-temporal, tauopatia multissistémica, etc. [39, 40]. Esta proteína pode ser observada tanto em neurónios como em células da glia [41]. Na DA, a PHF- $\tau$  é detectada sob a forma de tranças neurofibrilares nos neurónios, como filamentos nos neutrófilos e como neurites distróficas nas placas senis. Assim, a fosforilação anormal da proteína tau desempenha um papel fundamental na patofisiologia da DA [42].

### 1.3.3. Alterações neuropatológicas

Durante o envelhecimento ocorrem alterações a nível cerebral, tais como a diminuição do peso do cérebro, a dilatação ventricular, a atrofia giral e a perda selectiva de neurónios em diferentes regiões cerebrais [43].

As placas senis (PS), a nível extracelular e as tranças neurofibrilares (TNF) intracelulares, são as características patológicas da DA e são consideradas um reflexo dos processos neurodegenerativos que ocorrem nesta patologia [44, 45]. As PS são constituídas principalmente por proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) na sua forma insolúvel e fibrilar [46]. Outros constituintes destas placas incluem neurites distróficas, astrócitos reactivos e células da microglia activadas. Para além disto, as PS contêm numerosas moléculas como proteoglicanas e factores do complemento. Adicionalmente, foram também observadas no tecido cerebral de doentes de Alzheimer placas difusas (não fibrilares), compostas principalmente por  $A\beta$  e sem a presença de neurites distróficas. Considera-se que estas placas se desenvolvem e vão dar origem às placas neuríticas [47].

A formação de proteínas tau anormalmente fosforiladas é também uma característica da DA. Este processo de fosforilação, que também pode ser detectado noutras doenças degenerativas, conduz à produção de tranças neurofibrilares, as quais são inclusões intraneuronais de PHF- $\tau$  [47].

Tanto as SP como as TNF são observadas no envelhecimento normal, embora com uma extensão menor e são morfológicamente idênticas àquelas observadas em doentes de Alzheimer [48]. O número de TNF foi correlacionado com o grau de demência [49, 50]. Na DA, as TNF são observadas em primeiro lugar nas estruturas do lobo temporal medial,



especialmente no córtex entorrinal e no hipocampo. Com a progressão da doença, estas regiões tornam-se mais severamente afectadas, e as PS e TNF distribuem-se por todas as áreas corticais [51]. A principal diferença entre os cérebros de idosos normais e de doentes de Alzheimer centra-se no número mais elevado de PS e, particularmente, de TNF encontrado na DA [52].

A perda neuronal, quando presente, é geralmente ligeira durante o envelhecimento normal. A maior extensão de perda neuronal e redução no volume cerebral durante o envelhecimento é observada a nível do lobo frontal [53-55]. A perda neuronal, principalmente ao nível das células colinérgicas, é reconhecida como sendo um componente importante da DA [47]. Alguns estudos encontraram correlações mais fortes entre o defeito cognitivo e a perda de neurónios, do que com as PS e TNF [52, 56]. O córtex temporal geralmente apresenta uma perda neuronal mais severa do que o córtex frontal. Gomez-Izla et al demonstraram uma perda neuronal severa no córtex entorrinal, mesmo nas fases mais ligeiras de DA [57]. O facto da perda neuronal não ocorrer nesta região durante o processo de envelhecimento normal é consistente com a hipótese de que a DA e o envelhecimento não fazem parte de um espectro contínuo e sugere que o envelhecimento normal e a DA podem ser diferenciados tanto anatomicamente como clinicamente [57]. Para além disto, muitos estudos demonstraram uma redução sináptica na ordem dos 15-20% no córtex frontal durante o envelhecimento normal [58, 59]. Na DA, o grau de perda sináptica no córtex frontal excede aquele encontrado no envelhecimento normal e apresenta uma forte correlação com os defeitos cognitivos [60, 61]. Assim, as alterações observadas na DA são qualitativamente semelhantes às encontradas no envelhecimento normal, no entanto, apresentam-se quantitativamente aumentadas.

## **2. Conceito de Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL)**

Os indivíduos que desenvolvem uma demência degenerativa como a doença de Alzheimer passam por um período intermédio entre o envelhecimento normal e a doença. DCL é o termo que descreve esta zona de transição entre o envelhecimento normal e a demência. [62-66]. Clinicamente, os indivíduos com DCL apresentam um defeito de memória significativo, frequentemente acompanhado por defeitos funcionais de atenção, linguagem, funções visuo-espacial e psicomotora, mas não cumprem os critérios actuais para serem considerados demenciados [66, 67].

O campo de investigação em DCL está actualmente a direccionar-se para a identificação de factores de risco para a progressão da doença, com o objectivo de integrar intervenções terapêuticas cada vez mais cedo de modo a atrasar ou até prevenir o início ou a progressão do processo patológico.

### **2.1. História natural do DCL**

O DCL é um grupo heterogéneo com vários resultados clínicos [67]. A maior parte dos indivíduos com DCL progridem para demência [68, 69]. O tipo de demência mais comum resultante da fase de DCL é a DA, sendo a taxa de progressão anual de 10 a 15 %, a qual é dez vezes superior quando comparada com a taxa de demenciação a partir do envelhecimento normal (Figura 2) [67]. Tem sido sugerida uma evolução de DCL para DA dependente do tempo, ou seja, os indivíduos com defeito cognitivo têm um risco aumentado de progredirem para demência durante um período de 3 anos, no entanto este risco começa a diminuir depois deste ponto [68]. Alguns indivíduos com DCL podem nunca progredir numa extensão significativa para demência [67]. Este subgrupo de DCL inclui os sujeitos que sofrem um defeito funcional da memória induzido por desordens psicológicas, tais como a depressão, ansiedade ou desordens somáticas, sendo que a função cognitiva destes doentes pode melhorar depois de alguns meses [70, 71]. Também é possível que o DCL se sobreponha com indivíduos saudáveis que não vão progredir para demência neste ponto [64].

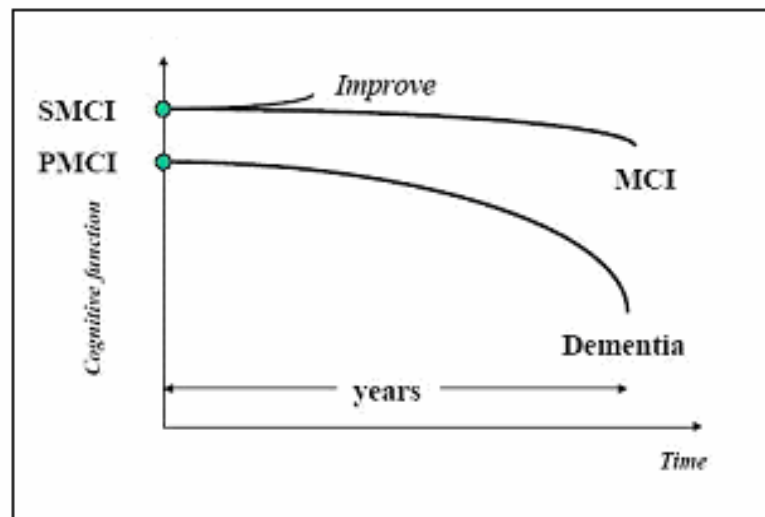


Figura 2. Modelo da progressão do Defeito Cognitivo Ligeiro.

## 2.2. Critérios de diagnóstico de DCL

Não estão estabelecidos critérios formais para o diagnóstico de DCL. Este é principalmente baseado em testes neuropsicológicos, no entanto, variam de investigador para investigador e são modificados ao longo do tempo.

Os critérios normalmente usados na clínica *Mayo* são os critérios estabelecidos por Petersen [64]. O diagnóstico de DCL é estabelecido se os doentes apresentarem:

- 1) queixas de memória,
- 2) as actividades do dia-a-dia normais,
- 3) uma função cognitiva geral normal,
- 4) um defeito de memória relacionado com a idade e
- 5) ausência de demência.

No entanto, outros tipos de DCL foram propostos posteriormente como o DCL com múltiplos domínios ligeiramente afectados e o DCL com defeito num domínio único que não a memória. Outros estudos usam a *Global Deterioration Scale* (GDS)=3 e/ou a *Clinical Dementia Rating Scale* (CDR)=0.5 como critérios de diagnóstico de DCL [72, 73].

### 2.3. Outras definições de Defeito Cognitivo Ligeiro

Têm sido usados outros conceitos para descrever o estado cognitivo entre o envelhecimento normal e a demência ligeira, como por exemplo o Defeito de Memória Associado à Idade (*Age-Associated Memory Impairment* – AAMI), o Declínio Cognitivo Associado à Idade (*Age-Associated Cognitive Decline* – AACD), o Defeito Cognitivo Sem Demência (*Cognitive Impairment No Dementia* – CIND) e a Demência Questionável (*Questionable Dementia* – QD).

O Defeito de Memória Associado à Idade (DMAI) refere-se a pessoas saudáveis com mais de 50 anos de idade que apresentam queixas subjectivas de memória, em que o seu desempenho se encontra pelo menos 1 desvio padrão (DP) abaixo do normal em testes de memória. São indivíduos não demenciados e que não possuem outra condição médica ou psiquiátrica que possa levar a este declínio na memória [74]. É uma entidade geralmente vista como um fenómeno do envelhecimento normal [75]. No entanto, alguns investigadores questionam o facto de este defeito se apresentar também como um contínuo com a DA [76]. Hanninen registou uma taxa de 9% de indivíduos com DMAI que desenvolveram demência, num estudo longitudinal de 3,6 anos [71]. Por outro lado, Bartres-Fas demonstrou que os indivíduos que cumpriam os critérios para DCL e DMAI apresentavam um perfil genético e neuropsicológico mais semelhante àquele encontrado na DA, quando comparados com indivíduos que apenas cumpriam os critérios de DMAI [77]. Foi também encontrada uma disfunção e uma atrofia no lobo frontal destes indivíduos, no entanto, as alterações estruturais do hipocampo não foram confirmadas num estudo posterior [78, 79].

O conceito de Declínio Cognitivo Associado à Idade (DCAI) compreende múltiplos domínios de declínio cognitivo [80]. O critério, desenvolvido por um grupo de trabalho da *International Psychogeriatrics Association* (Wilmette, Illinois) e da Organização Mundial de Saúde (Geneva, Switzerland), refere-se a um declínio gradual em qualquer área cognitiva com pelo menos seis meses de duração e *performance* com pelo menos 1 DP abaixo do normal para a idade em testes neuropsicológicos relevantes. A prevalência de DCAI foi estimada em 19,3% na população em geral e a taxa de conversão para demência foi reportada como sendo de 28,6% num estudo longitudinal de 3 anos [81].

O Defeito Cognitivo Sem Demência (DCSD) define-se com um *score* de 1 DP abaixo

do normal no MMSE, tendo em conta a idade e grau de escolaridade dos indivíduos, no projecto *Kungsholmen* (Sweden). Um terço dos sujeitos progrediu para demência durante um estudo de 3 anos [82]. O estudo Canadano de DCSD apresentou uma taxa de progressão para demência de 42% em 5 anos [83].

A demência questionável é definida com um *score* de 0.5 na CDR. Entre 19 a 41% dos indivíduos com demência questionável converteram o seu estado para demência em 2,5 a 3 anos de seguimento [84, 85].

## 2.4. Determinação neuropsicológica de DCL

No DCL podem detectar-se defeitos cognitivos em múltiplos domínios. A memória episódica, especialmente a nível de evocações tardias, é a manifestação cognitiva mais comum, anos antes do início da demência [86, 87]. O defeito noutros domínios cognitivos envolve a função verbal, processos visuo-espaciais, atenção, função executiva, bem como pensamento abstracto e retenção [66, 87, 88]. O *Mini-Mental State Examination* (MMSE) tem sido descrito como um teste bastante útil na predição do início da DA [89, 90].

As memórias de procedimentos, bem como as capacidades sensoriais e motoras têm sido consistentemente demonstradas como estando relativamente bem preservadas nos estadios iniciais da DA [89, 90]. Foi também demonstrado que indivíduos com DCL que apresentem um defeito único num domínio que não a memória têm maiores probabilidades de desenvolver outra doença neurodegenerativa, como afasia progressiva, demência vascular, ou demência por corpos de Lewy [63].

## 2.5. Neuropatologia do DCL

No DCL, as tranças neurofibrilares e as placas neuríticas aparecem na estrutura límbica e no neocortex [91, 92]. A formação inicial das tranças ocorre separadamente das placas. As tranças formam-se em primeiro lugar nas estruturas límbicas, enquanto as placas se formam preferencialmente no neocortex [91].

No DCL foi encontrada uma elevada densidade de tranças neurofibrilares no córtex transtorrinal e córtex perirrinal, no hipocampo, no complexo magnocelular, bem como no

núcleo antero-dorsal do tálamo, quando em comparação com o envelhecimento normal. Contrariamente, foram encontrados números inferiores de tranças a nível do neocortex cerebral [6, 91]. No DCL, tanto as placas difusas como as placas neuríticas foram encontradas distribuídas no córtex cerebral, principalmente no córtex temporal e orbital, tendo as áreas límbicas relativamente menos placas que o neocortex [91, 93]. O envelhecimento conduz a pouca ou nenhuma perda neuronal, no entanto, há uma perda neuronal substancial no córtex entorrinal, especialmente na camada II e no sector CA1 do hipocampo na DA muito ligeira [57].

### ***3. Processos metabólicos que levam à morte celular na DA e DCL***

#### **3.1. Reacção inflamatória na DA**

As reacções inflamatórias observadas na DA, ou seja, o aumento no número de astrócitos e microglia activados e a activação do complemento, indicam que os processos inflamatórios podem ser de grande importância na neurodegeneração [94, 95].

Os astrócitos activados são, no tecido cerebral, células imunocompetentes e fagocitam material reconhecido como não-próprio como a amiloide [96, 97]. Os astrócitos podem degradar lentamente quantidades limitadas de A $\beta$  mas este mecanismo pode ser esgotado por um excesso de proteína [98, 99]. A importância dos astrócitos activados na patogénese da DA prende-se também com o facto da microglia activada pela A $\beta$  libertar interleucinas e interferons provocando neurodegeneração [100-102].

Da mesma forma que o tecido danificado e a presença crónica de materiais anormais inertes são estimulantes clássicos dos processos inflamatórios na periferia, também a A $\beta$ , as tranças e a neurodegeneração são as fontes mais prováveis de inflamação nos cérebros de doentes de Alzheimer. Assim, à semelhança do que acontece na periferia, um enorme número de subsistemas inflamatórios entram em cena. Como uma rede, as interacções entre estes sistemas tornam possível e até provável que um conjunto de mediadores induza grande parte dos outros mediadores envolvidos. Assim, parecem estar envolvidas na patofisiologia da DA, vias como o complemento, citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda e outras [103].

### 3.1.1. Astrócitos

Os astrócitos compreendem um terço do volume do córtex cerebral, formando o elemento celular mais numeroso no tecido cerebral. Eles dividem-se em diferentes subclasses de acordo com a sua morfologia e localização. Os astrócitos fibrosos são principalmente vistos na substância branca enquanto os astrócitos protoplasmáticos preenchem a substância cinzenta [104]. No entanto, existe ainda uma enorme heterogeneidade dentro dos astrócitos fibrosos e protoplasmáticos baseada no perfil enzimático, em marcadores antigénicos, em transportadores, receptores e canais iónicos [105].

Os astrócitos desempenham claramente um papel de suporte no tecido cerebral normal, mas existe uma grande diversidade de propriedades funcionais. Estas células estão envolvidas em muitas funções cerebrais importantes, como a migração neuronal, crescimento neurítico, sinaptogénese e plasticidade sináptica, manutenção da barreira hemato-encefálica, regulação do metabolismo da água, iões e aminoácidos, energia e suporte de nutrientes, modulação de respostas imunes/inflamatórias e funções fagocíticas [105].

A resposta dos astrócitos a uma lesão no SNC é descrita por um aumento no número e tamanho dos astrócitos que expressam a *fibrillary acidic protein* (GFAP), denominados de astrócitos activados [106, 107]. A GFAP é uma proteína intermediária do citoesqueleto expressa pela astroglia. O factor de maturação da glia (FMG) bem como a S100 $\beta$  aumentam a proliferação astrocítica e induzem alterações morfológicas. O estímulo bioquímico que conduz à activação dos astrócitos pode vir da microglia, dos neurónios e/ou dos oligodendrócitos, entre outros [105]. Estudos *in vitro* demonstraram que a libertação da citocina IL-1 $\beta$  da microglia activada é um activador especialmente importante. O córtex humano contém, normalmente muito poucos astrócitos activados [104]. O seu número aumenta com o envelhecimento em algumas regiões cerebrais [108, 109]. Quando comparado com controlos com idades semelhantes, o número de astrócitos activados é superior em diferentes doenças neurodegenerativas, doenças desmielinizantes, infecções no SNC, tumores, traumas e especialmente na DA [109-114].

Em indivíduos não demenciados, a imunoreactividade da GFAP está normalmente limitada à área subpial e à substância branca, enquanto em cérebros de doentes de

Alzheimer foram observados astrócitos activados a rodear as placas senis [115, 116]. Kato *et al* demonstraram que os processos astrocíticos também penetravam nas placas senis [117]. A quantidade de GFAP em homogeneizados cerebrais correlaciona-se com a quantidade de TNF e PS [118].

O papel dos astrócitos na DA ainda não é completamente conhecido. Tem sido proposto que a A $\beta$  possa induzir a expressão de citocinas nos astrócitos [119-121]. A secreção de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6,  $\alpha$ -1-antiquimotripsina, C1q, C5b-9, MIP-1 $\alpha$  e - $\beta$ , MCP-1) nos astrócitos activados pode ser um dos factores que conduz à neurodegeneração [104]. Foi também sugerido que os astrócitos activados possam tomar parte na produção da amiloide. O factor básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF) estimula a produção de APP, a qual se encontra aumentada nos astrócitos activados. Por outro lado, a amiloide estimula a produção de bFGF, formando um ciclo contínuo. Os astrócitos podem também estar associados ao processamento da APP através da produção de proteases e respectivos inibidores (catepsina D and  $\alpha$ -1-antiquimotripsina) [105].

Os astrócitos também providenciam um suporte para a função neuronal. Eles podem, por exemplo, remover o glutamato libertado pelas sinapses (o principal neurotransmissor excitatório), provocando o final da sua acção estimulatória e prevenindo o dano neuronal [122]. Em 1989 Rosenberg e Aizenman, demonstraram que neurónios em culturas sem astrócitos eram muito mais vulneráveis à toxicidade provocada pelo glutamato, quando comparados com culturas neuronais com astrócitos [123].

### 3.1.2. Microglia

Em 1933 del Rio-Hortega identificou as células da microglia através de uma impregnação com prata [124]. As células da microglia compreendem até 20% da população celular glial total, e são a primeira linha celular a responder a insultos do SNC [125]. As células da microglia residentes que se encontram em repouso tornam-se activadas em resposta a traumas, infecções e inflamações do SNC. Após activação elas expressam antigénios dos Complexos Major de Histocompatibilidade I e II (MHC I e MHC II), proliferam no cérebro doente, exibem actividade fagocítica, libertam radicais livres, produzem proteinases e secretam agentes citotóxicos, induzindo a morte de neurónios e oligodendrócitos. Estas células secretam citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6,



IL-10, IL-12, IL-15 e factores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  e  $-\beta$ ) no cérebro humano [125, 126].

As células da microglia são consideradas os macrófagos residentes do SNC [96] e representam o sistema imune do tecido cerebral [127]. Tem sido sugerido que a microglia activada é uma fonte de factores tróficos, que suportam o desenvolvimento e normal função das células do SNC [97]. As células da microglia têm origem em monócitos existentes no SNC depois deste ter sido vascularizado [125]. A microglia assume diferentes formas no SNC humano adulto, tais como ramificada, amebóide e em forma de roda [96]. Recentemente foi adoptada uma classificação que reflecte o estado de activação destas células: microglia em repouso, activada e fagocítica amebóide [126]. Este tipo celular não apresenta qualquer localização preferencial para superfícies vasculares ou neuronais, como acontece frequentemente com os astrócitos [115], estando presente em número semelhante nas substâncias branca e cinzenta [128].

O importante papel da microglia na progressão DA é evidenciado pela presença de grande quantidade destas células activadas, a nível do tecido cerebral de doentes de Alzheimer, bem como pela existência de agregados de microglia reactiva em volta das placas senis. Por outro lado, a exposição deste tipo celular a peptídeos A $\beta$  aumenta a expressão génica e a produção proteica de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas, nestas células. Assim, a microglia nos cérebros DA pode ser tida como um agente de destruição das placas senis, mas ao mesmo tempo, como uma fonte de substâncias citotóxicas [126].

### 3.1.3. Vias que envolvem citocinas

As citocinas parecem envolver na microglia e nos astrócitos processos de sinalização intra e extracelulares semelhantes àqueles encontrados na periferia, apesar de também terem sido propostos mecanismos únicos no SNC. Virtualmente todas as citocinas estudadas na doença de Alzheimer parecem estar sobre-reguladas nesta patologia. No chamado ciclo das citocinas, as citocinas pró-inflamatórias participam num espectro de eventos de sinalização que continuamente está em *feedback* e a influenciar outras citocinas.

### IL-1 $\beta$

A interleucina 1 $\beta$  foi anteriormente descrita como uma citocina com elevado poder imunomodulador que induz vários mediadores inflamatórios nos astrócitos e nos neurónios [129]. A sobre-expressão desta proteína é uma característica consistente dos cérebros DA, com estudos imunohistoquímicos de marcação dupla a localizarem a IL-1 $\beta$  na microglia associada a placas [130, 131]. Para além da iniciação e manutenção de eventos relacionados com a inflamação em neurónios, esta citocina parece estar directamente envolvida na patofisiologia das alterações observadas na DA [129, 130]. A sua expressão regional em volta das placas senis e perfil temporal de imunorreactividade relativa à patologia implica a IL-1 $\beta$  como um mediador na formação das placas senis e das tranças neurofibrilares. Esta ideia é apoiada pelos resultados que descrevem a síntese e processamento da APP influenciados pela IL-1 $\beta$  com uma produção aumentada de A $\beta$  [132-134]. As evidências do envolvimento desta citocina na formação de tranças advêm de estudos que usam *pellets* implantados em tecido cerebral para diminuir a libertação de IL-1 $\beta$  de forma a imitar o estado de inflamação crónica [135]. Nestes estudos, a libertação de IL-1 $\beta$  estava associada com a fosforilação de neurofilamentos e com o aumento da imunorreactividade da tau no hipocampo de ratinhos.

Para além da mediação nos processos de evolução das placas e das tranças, a IL-1 $\beta$  pode também ter um papel a nível da disfunção colinérgica encontrada na DA. A acetilcolinesterase é uma enzima que quebra a acetilcolina e encontra-se aumentada em certas regiões dos cérebros de doentes de Alzheimer. Acredita-se que este aumento minimize a disponibilidade de acetilcolina nas sinapses, levando a um declínio cognitivo. Tanto a expressão como a actividade neuronal desta enzima estão aumentadas em células PC-12 *naive* após co-incubação com células da microglia estimuladas num meio rico em APP. O papel da IL-1 $\beta$  nesta cascata foi demonstrado *in vivo* com a observação de que a libertação crónica desta citocina, em córtex cerebral de ratinhos aumentava os níveis de mRNA de acetilcolinesterase [136]. No seu conjunto estes resultados indicam um papel importante da IL-1 $\beta$  na inflamação, patologia e disfunção neuronal associados com a DA.

### IL-6

A interleucina 6 é uma citocina pleiotrópica que medeia as respostas imunes e as reacções inflamatórias que afectam o crescimento e diferenciação celular do SNC [137]. Estas acções ocorrem através de interacções com receptores específicos solúveis ou ligados

a membranas que formam o complexo receptor da IL-6 activo (IL-6RC) [138]. A IL-6 é expressa no sistema nervoso durante o desenvolvimento. Normalmente existe em níveis dificilmente detectados no SNC do adulto, sendo fortemente induzida em condições patológicas [139]. Tanto a microglia, a astroglia, os neurónios e as células endoteliais parecem ser capazes de produzir IL-6 [140]. Ao nível molecular vários peptídeos aumentam a IL-6 cerebral. Nos astrócitos é obtida uma indução particularmente forte desta citocina por acção do TNF- $\alpha$ , OSM e IL-1 $\beta$  [141].

Apesar do aumento da expressão desta citocina ser de uma forma geral prejudicial, podendo ajudar ao desenvolvimento de processos patológicos associados com diversas doenças do SNC, também existem evidências da IL-6 poder ter propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e de uma maneira geral benéficas, sob condições e níveis de exposição restritos. Por exemplo, foi sugerido que a IL-6 desempenha um papel central na regulação da função e sobrevivência neuronal [142].

Mais regularmente a IL-6 é vista como uma citocina pró-inflamatória, com actividade destrutiva, que induz proteínas de fase aguda, actua como pirógeno, aumenta a permeabilidade vascular, a activação linfocitária e a síntese de anticorpos. Ratinhos transgénicos que expressam de uma forma crónica níveis aumentados desta citocina sob o controlo de um promotor específico de astrócitos exibem defeitos na aprendizagem que se correlacionam com a idade, com a dose e com alterações neuropatológicas [143]. Pelo contrário, ratinhos com defeitos a nível desta citocina apresentam défices sensoriais e regeneração axónica mais lenta [144].

Desde a sua primeira identificação no cérebro de doentes de Alzheimer, numerosas evidências têm vindo continuamente a indicar o papel proeminente da IL-6 nesta doença [145]. Após ter sido detectada a expressão de IL-6 no córtex frontal, temporal, parietal e occipital do cérebro de doentes de Alzheimer e de controlos [146], tem sido sugerido, por exemplo, que o alelo C de um polimorfismo VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) no gene desta citocina está relacionado com uma actividade diminuída desta proteína nos seres humanos [147]. Foi também descrito que o mesmo alelo está associado com o início da DA numa idade mais avançada [148]. Outros estudos sugerem que a IL-6 possa modular a síntese de APP [149].

### **TNF- $\alpha$**

O factor de necrose tumoral  $\alpha$  é uma citocina que se encontra elevada no soro, LCR,

córtex e culturas de células gliais após exposição a Abeta [150, 151]. No entanto, as acções patofisiológicas do TNF- $\alpha$  na DA são surpreendentemente controversas dado o seu papel como um peptídeo pró-inflamatório e citotóxico na periferia e em situações patológicas do SNC como o trauma cerebral, a esclerose múltipla e a doença de Parkinson [152-154]. Um excesso de TNF- $\alpha$  pode induzir a morte de neurónios corticais, mas esta citocina também foi descrita como um factor trófico em neurónios do hipocampo de ratinhos, como protector contra o glutamato, radicais livres e toxicidade da A $\beta$  em culturas de neurónios [155-157]. De acordo com este papel neuroprotector estão os estudos que envolvem ratinhos que não possuem o receptor TNF (TNFR), uma vez que mostram que estes animais desenvolvem grandes perdas neuronais após lesões quando comparados com animais que possuem este receptor [158]. Estes estudos também sugerem que a activação dos neurónios pelo TNF- $\alpha$  induz a expressão de moléculas protectoras, incluindo a enzima superóxido dismutase (SOD) [159]. Contrariamente, a inibição farmacológica da libertação ou da actividade do TNF- $\alpha$  diminui os danos neuronais em modelos de isquémia cerebral [160]. O TNF- $\alpha$  é um potente estimulador do NF- $\kappa$ B, um factor de transcrição que eleva a expressão de factores pró-inflamatórios do complemento e da ciclooxigenase (COX), bem como de factores de sobrevivência como a SOD e o Bcl-2 [161]. A dicotomia dos resultados das acções do TNF- $\alpha$  no SNC pode ser explicada por vários factores. Por um lado os tipos celulares e as espécies envolvidas podem ser decisivos. As acções tóxicas desta citocina em neurónios corticais humanos e as acções tróficas do TNF- $\alpha$  em neurónios corticais de ratinhos são exemplo disso [158, 162]. Tem sido também sugerido que as linhas celulares transformadas serão mais susceptíveis à toxicidade exercida pelo TNF- $\alpha$  quando comparadas com linhas não transformadas [163]. Outra possibilidade advém do facto do TNF- $\alpha$  exercer as suas funções biológicas através da activação de dois receptores distintos, o receptor TNF p55 (TNFR tipo I) e o receptor TNF p75 (TNFR tipo II) [164]. Estes dois receptores partilham níveis baixos de homologia tanto na região extracelular como na região intracelular. O receptor p55 contém a nível intracelular um domínio de morte e contribui para a morte celular quando activado [153]. Por outro lado, o receptor p75 desempenha funções tróficas ou protectoras neuronais [165].

## **IL-12**

A interleucina 12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades ligadas por ligações dissulfeto e designadas por p35 e p40 [166]. A subunidade p40 é

homóloga a receptores de citocinas, enquanto a subunidade p35 é semelhante à IL-6 [167]. Os genes humanos que codificam as subunidades p35 e p40 localizam-se em cromossomas diferentes (cromossomas 3 e 5, respectivamente) e a expressão proteica é, consequentemente, regulada de forma independente. Quando co-expressas na mesma célula estas subunidades formam um heterodímero biologicamente activo, denominado p70 [168]. A IL-12 é produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e, em menores quantidades, por linfócitos B. Enquanto a p35 é expressa ubíqua e constitutivamente em baixas quantidades, a expressão de p40 está limitada às células fagocitárias que produzem IL-12p70.

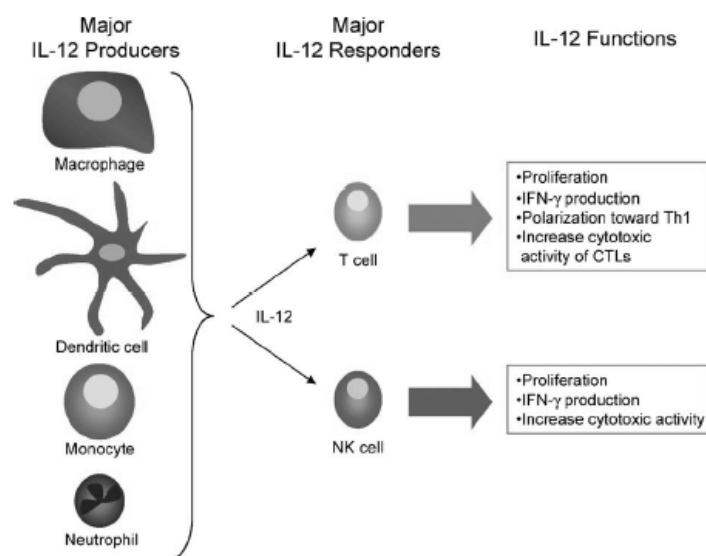


Figura 3. Células capazes de produção e de resposta à IL-12. As células apresentadoras de antígenos, células fagocíticas incluindo monócitos e macrófagos, células dendríticas e neutrófilos são os principais produtores desta citocina (adaptado de Waterford, WT. et al. 2003 [169]).

Vários organismos patogénicos induzem níveis elevados de produção de IL-12p40 e IL-12p70, incluindo bactérias gram positivas e negativas, parasitas, vírus e fungos. Os produtos microbiológicos como LPS, peptidoglicanos e DNA bacteriano induzem a produção independente de IL-12 em células T através de uma sinalização mediada por receptores *Toll-like* [170].

A produção de IL-12 é regulada de forma positiva pelo INF- $\gamma$ , o qual também é induzido pela própria IL-12. Esta citocina participa num mecanismo de retrocontrolo positivo promovendo a secreção de INF- $\gamma$ , o qual, por sua vez, potencia a produção de

mais IL-12 por parte dos monócitos e polimorfonucleares [171]. A produção desta citocina é inibida por outras citocinas como IL-10, IL-11, IL-13 e interferons do tipo I.

Uma das principais acções da IL-12 é a indução da produção de outras citocinas, particularmente de INF- $\gamma$  o qual coordena a resposta imune subsequente. A IL-12 aumenta a expressão do receptor da IL-18, actua nas células dendríticas para induzir maior produção de IL-12 e promove a maturação das células de Langerhans da pele. Aumenta a actividade citolítica das células T e NK e regula a resposta imune adaptativa desenvolvendo um papel crucial no desenvolvimento das células T CD4+ *naive* em células T *helper* [169].

### 3.2. Apoptose

Existem duas vias principais que conduzem à morte celular, a apoptose e a necrose, que podem ser reconhecidas de acordo com diferenças morfológicas. As principais características bioquímicas da apoptose são a fragmentação do DNA e a necessidade da síntese *de novo* de proteínas e ácidos nucleicos, características estas que não são observadas na necrose [172, 173].

Na morte por necrose, as células morrem devido à actuação de factores extrínsecos enquanto na apoptose a sua morte deve-se a um mecanismo interno [174]. Tem sido sugerido que o stresse oxidativo, a toxicidade excitatória, a toxicidade provocada pelo cálcio e a deficiência de factores de sobrevivência possam induzir a apoptose nos neurónios. A via que conduz a este processo de apoptose é regulada pela activação e inactivação de genes específicos (ex.: c-myc, bcl-2 e p53) [175, 176]. A apoptose desempenha um papel extremamente importante a nível da renovação celular, embriogénese, imunogénese, regulação hormonal, cancro, etc. [173, 177]. Por exemplo, na embriogénese são produzidos neurónios em excesso, no entanto, os únicos que sobrevivem são aqueles que recebem quantidades suficientes de *Nerve Growth Factor* (NGF) produzidas por células alvo que vão ser enervadas por estas mesmas células. Assim, durante a embriogénese, a morte neuronal parece permitir o ajuste do número de células ao tamanho do alvo a ser enervado [173].

A perda neuronal tem sido observada no neocortex durante o envelhecimento, no entanto existem também estudos que afirmam que não ocorre perda neuronal durante o envelhecimento normal [178, 179]. É hoje sugerido que em vez de perda neuronal, as

alterações relacionadas com a idade possam, mais provavelmente, dever-se à retracção no tamanho dos neurónios. No entanto, a perda neuronal é comum a nível das doenças neurodegenerativas e é acentuada na DA [180, 181], especialmente nas estruturas límbicas. A via que conduz a esta morte celular na DA é a apoptose [181-183], no entanto Stadelmann *et al* sugerem que a fragmentação do DNA na DA indica um aumento da vulnerabilidade neuronal em vez de apoptose [184].

Na doença de Alzheimer o estímulo que conduz à apoptose pode ser a A $\beta$ , uma vez que neurónios em cultura entram em apoptose após a indução por A $\beta$ . A regulação deste mecanismo pode envolver a sob-expressão de Bcl-2 na presença de A $\beta$  [185]. Por outro lado LeBlanc *et al* sugeriram que a produção aumentada de A $\beta$  é uma consequência da apoptose neuronal e que a apoptose na realidade activa proteases envolvidas no processamento da APP [186, 187]. Vários estudos apresentam resultados relativos à associação entre a apoptose e as lesões características da DA [188-190]. São encontrados dados contraditórios, ou seja, algumas associações positivas e inexistência de associações entre a A $\beta$ , as PS, as TNF e as células apoptóticas. Lassmann *et al* descobriram que muitos doentes de Alzheimer exibem grandes quantidades de A $\beta$  associadas à inexistência de sinais morfológicos de células apoptóticas [190].

### 3.2.1. Proteínas Fas e FasL

O receptor de superfície Fas (CD95/Apo-1) é uma proteína da superfície celular que pertence à família de receptores TNF e medeia a apoptose numa larga variedade de células. Fazem parte desta família, moléculas com domínios extracelulares característicos, ricos em cisteína, os quais controlam a ligação de ligandos e a auto-agregação espontânea em trímeros [191, 192]. Um subgrupo dos membros desta super-família de receptores TNF que inclui o Fas, o TNF-R1 e o p75NTR são frequentemente denominados receptores de morte devido à presença intracelular de domínios de morte. Estes consistem numa série de seis  $\alpha$ -hélices que podem ligar outras proteínas que possuam também domínios de morte. Estes domínios permitem estabelecer a ligação entre o Fas da superfície celular com cascatas de transdução de sinais intracelulares, através de moléculas adaptadoras que também contêm domínios de morte [193]. Esta denominação de domínio de morte foi originalmente utilizada para reflectir a ligação do Fas às vias apoptóticas. No entanto, estes domínios

podem iniciar outras vias, resultando algumas delas em proliferação ou sobrevivência, em vez de morte. Assim, esta denominação pode ser enganosa uma vez que tanto o receptor como o seu domínio intracelular podem traduzir diferentes tipos de sinais [194].

O Fas ligando (FasL), que é expresso predominantemente por células T activadas, é uma proteína membranar tipo II pertencendo à família TNF. O FasL medeia a morte celular ao efectuar o *cross-linking* do receptor Fas nas células sensíveis à apoptose por Fas [195]. A susceptibilidade das células T iniciarem um processo de apoptose também é controlada pela família de homólogos do Bcl2.

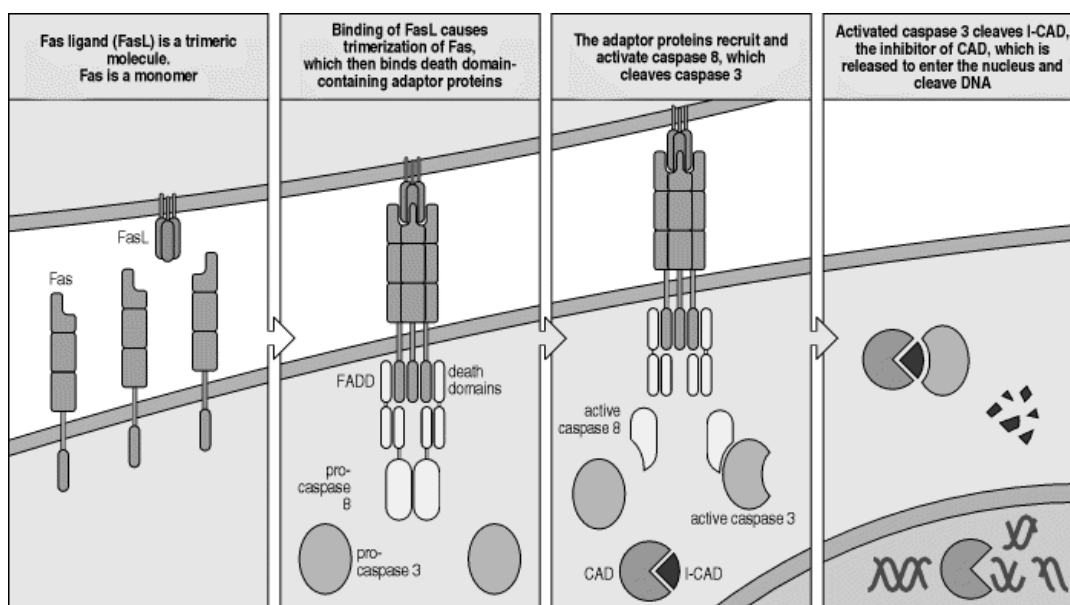


Figura 4. A ligação do FasL ao Fas inicia o processo apoptótico. O FasL, um homotrímero, ao ser reconhecido pelo Fas induz a trimerização do receptor provocando a junção dos domínios de morte das caudas citoplasmáticas do receptor. A cascata activada culmina na activação de DNases por quebra da I-CAD (proteínas inibidoras) que torna as CAD (*Caspase-Activatable DNase*) inactivas. Após a activação, estas proteínas podem entrar no núcleo e clivar o DNA em fragmentos de 200 pares de bases, característicos de apoptose (adaptado de Janeway, C. et al [196]).

Nos linfócitos, a apoptose desempenha um papel muito importante na manutenção do repertório de células T e na deleção de linfócitos T e B auto-reactivos, logo na limitação das respostas imunes [197]. Para além deste papel, o Fas pode aumentar a proliferação das células T e B activadas, de algumas células tumorais, de fibroblastos e de hepatócitos [198, 199]. Pode também iniciar alterações a nível inflamatório através do estímulo à secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 e da activação da caspase 1 via RIP. Para além disto o Fas pode estar envolvido no processamento e libertação de IL-1 [200, 201].



A proteína Fas é expressa no sistema nervoso tanto em neurónios como em células da glia. A morte neuronal induzida por Fas tem sido extensivamente descrita. No entanto também existem evidências que o Fas desempenha outros papéis, não apoptóticos no sistema nervoso, como acontece noutros tecidos [202]. No tecido cerebral de doentes de Alzheimer a expressão de Fas está ausente de áreas com degeneração manifestamente severa, encontrando-se sobre-regulada em áreas adjacentes. Assim, é possível que a expressão desta proteína possa aumentar durante processos neuropatológicos de forma a desempenhar funções neuroprotectoras e neurorregenerativas.

A principal evidência causal de morte induzida por Fas no sistema nervoso ocorre sob circunstâncias de stresse oxidativo que induz a expressão de Fas e FasL em células neuronais *in vitro* e *in vivo* [203, 204].

De uma forma geral a proteína Fas pode levar à morte celular por apoptose, mas também pode resultar na proliferação celular, diferenciação ou secreção de citocinas.

### 3.2.2. Proteínas Bax e Bcl2

A apoptose é um processo activo regulado por proteínas da família Bcl-2 que ou bloqueiam ou aceleram a morte celular programada. As proteínas pertencentes a esta família são reguladores centrais da morte e sobrevivência neuronal [205].

O membro anti-apoptótico típico desta família, o Bcl-2, foi inicialmente descoberto devido ao seu envolvimento em cerca de 95% dos linfomas foliculares das células B, como resultado de uma translocação cromossomal [206, 207]. Os níveis elevados de Bcl-2 não actuam aumentando a proliferação, pelo contrário eles aumentam a sobrevivência celular, definindo assim, uma nova classe de oncogenes [208]. As proteínas pertencentes a esta família compartilham um certo número de domínios homólogos (BH). De uma maneira geral, os membros anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL contêm BH1-4, enquanto os membros pró-apoptóticos Bax, Bik, Blk, Hek, Bim, Bid e Noxa contêm apenas o domínio BH3 [209]. Muitas destas proteínas possuem uma cauda hidrofóbica no terminal C, a qual pode servir para as ancorar às membranas intracelulares.

O Bax é uma proteína pró-apoptótica de 21 kDa que foi identificada pela co-precipitação com a proteína Bcl-2 e que pode formar heterodímeros com Bcl-2 e Bcl-xL. No adulto o Bax tem uma expressão generalizada particularmente óbvia no rim, fígado e pâncreas, que

contêm pouca ou nenhuma Bcl2 [210].

As proteínas da família Bcl-2 regulam a cascata apoptótica principalmente ao nível da mitocôndria. Após activação por um sinal apoptótico, as proteínas desta família acumulam-se na membrana mitocondrial [205, 211]. Este facto está associado com alterações no potencial de membrana mitocondrial e com a libertação de vários factores pró-apoptóticos, incluindo o citocromo c, o qual, em conjunto com a Apaf-1, facilita a activação da cascata de caspases [212]. O impacto das proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas na mitocôndria pode ser inibido pelas proteínas Bcl-2 e/ou Bcl-xL [213]. Pensa-se que as proteínas desta família, regulem a membrana mitocondrial externa através da interacção com o canal aniónico dependente de voltagem e com outros componentes do complexo do poro de transição de permeabilidade da mitocôndria [214]. Assim, a perda do potencial de membrana mitocondrial leva à abertura desta estrutura conduzindo à libertação de citocromo c para o citoplasma levando à formação do apoptossoma e activação da caspase 9 [215]. Nos neurónios a libertação mitocondrial de citocromo c pode ocorrer independentemente da transição de permeabilidade [216]. O citocromo c libertado nestas condições pode ser mediado pela acção de membros pró-apoptóticos da família Bcl2 [217]. Existem também evidências que indicam que alguns dos membros desta família podem formar hetero e homodímeros com a formação inerente de canais iónicos [217, 218]. Esta capacidade é essencial para a função e regulação destas proteínas. O aumento da homodimerização do Bax estimula a translocação desta proteína, a activação de caspases e a morte celular [219]. Por outro lado, a heterodimerização do Bcl-2 com membros pró-apoptóticos pode inibir ou activar a apoptose, dependendo dos níveis relativos de cada proteína (Modelo Rheostat). As proteínas pró e anti-apoptóticas existem num equilíbrio bastante delicado na membrana mitocondrial. Uma mudança em determinada direcção pode determinar o destino da célula [220].

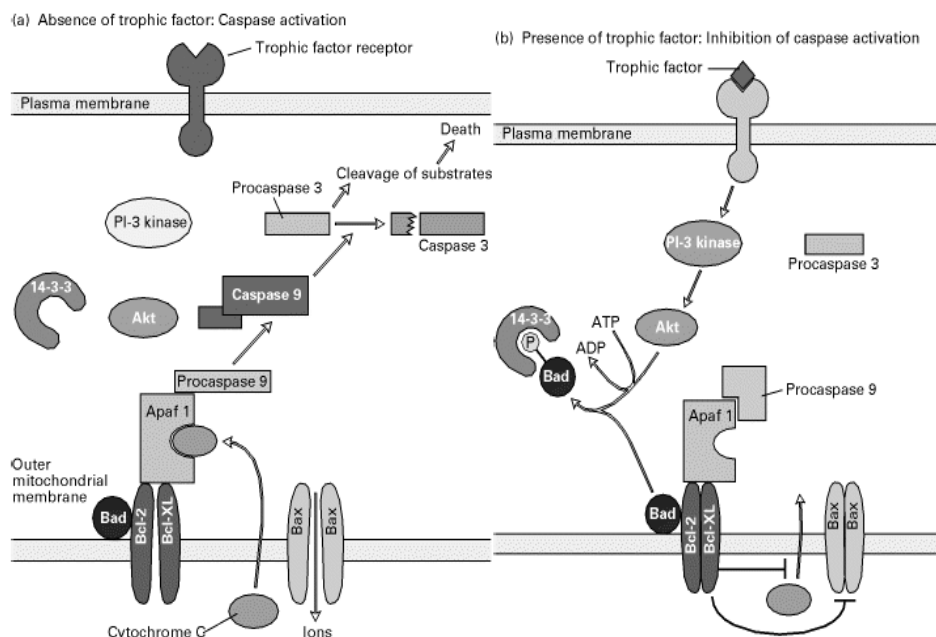


Figura 5. Modelos das vias intracelulares que levam à morte celular por apoptose ou à sobrevivência celular mediada por factores tróficos. A) A ausência de um factor trófico conduz à activação da cascata de caspases. B) A presença de um factor trófico inibe esta activação (adaptado de Lodish, H. et al. [221]).

A proteína Bcl-2 é extensamente expressa durante o desenvolvimento, enquanto no adulto a sua expressão é relativamente baixa no SNC, mas mantém-se elevada no SNP [222]. O Bax encontra-se sob-expresso no SNC de adultos mas altamente expresso no sistema nervoso durante o período de morte celular natural quando o número de neurónios é reduzido em cerca de 20 a 80%, presumivelmente para igualar o número de neurónios inervados com o tamanho do tecido alvo [223]. Animais com uma mutação que provoque a sobre-expressão de Bcl-2 têm mais cerca de 30 a 40% de neurónios do que animais sem mutação. Os neurónios que expressam maiores quantidades desta proteína estão protegidos contra a apoptose após a remoção do nervo ciático. Apesar dos mecanismos exactos envolvidos nestes processos não serem exactamente conhecidos, sabe-se que poderão estar relacionados com os efeitos do Bcl-2 na homeostase intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  [224]. A deficiência em Bax protege os neurónios de radiações ionizantes, de alterações nas condições iónicas extracelulares, da excitotoxicidade e da isquémia [225, 226].

Esta família de proteínas tem sido também implicada em várias doenças neurodegenerativas com a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Sabe-se que os genes das pré-senilinas 1 e 2 interagem com proteínas desta família [227].

### 3.3. Factores genéticos na doença de Alzheimer

Foi demonstrado que mutações em três genes diferentes podem provocar doença de Alzheimer de uma forma autossómica dominante: o gene da proteína precursora amilóide, o gene da pré-senilina 1 e o gene da pré-senilina 2 [228-230].

#### 3.3.1. Mutações no gene da APP

O complexo de mutações que rodeia os locais de processamento da APP, bem como a maior parte das mutações neste gene, têm como resultado a libertação de um fragmento de A $\beta$  mais depositável [231]. A maior parte dos casos com mutações neste gene apresenta o desenvolvimento de uma doença de Alzheimer típica, com uma idade de início da doença no final dos 40 ou início dos 50 anos de idade, sendo esta idade de início afectada pelo genótipo APOE [232]. As excepções a esta regra são a mutação E693G, a primeira a ser descrita, que causa hemorragia cerebral hereditária com amiloidose e a mutação A692G que algumas vezes é caracterizada por enfartes [233, 234].

#### 3.3.2. Mutações no gene da PS1

A maior parte das mutações no gene da PS1 conduz também ao desenvolvimento de uma doença de Alzheimer típica de uma forma completamente penetrante, com idades de início da doença a variarem entre os 30 e os 50 anos. Poucas mutações neste gene estão associadas com variantes pouco usuais de DA, caracterizadas por paraparese espástica e pela ocorrência de angiopatias massivas congofílicas em vez de placas neuríticas [235]. As idades de início da DA causada por mutações do gene da PS1 não são, normalmente afectadas pelo genótipo APOE. Todas as mutações alteram o processamento da APP resultando numa maior quantidade de A $\beta$ 42 produzida [236]. Praticamente todas as mutações são *missense*, com excepção da deleção  $\Delta 9$  ou das mutações que provocam a inserção ou deleção de apenas um aminoácido [237].

### 3.3.3. Mutações no gene da PS2

As mutações patogénicas no gene da PS2 parecem estar relacionadas com idades de início da doença muito variáveis, podendo numa mesma família, a mesma mutação, conduzir a idades de início entre os 40 e os 80 anos. A razão para esta disparidade não é clara, mas o genótipo APOE parece não ser um factor determinante. Foram identificadas apenas três mutações neste gene embora possam existir muitas outras que ainda não foram descobertas, provavelmente por serem a causa da doença em indivíduos que parecem casos esporádicos, ou por constituírem uma pequena percentagem dos casos de doença com início tardio [238]. A completa inactivação do gene PS2 em ratinhos não parece provocar alterações a nível do processamento da APP, sugerindo que o seu papel nesta via catalítica possa ser substituído pela PS1 [239].

### 3.3.4. Factores genéticos na doença de Alzheimer esporádica

A grande maioria dos doentes de Alzheimer inclui-se no grupo de doentes esporádicos, afectados por uma forma não familiar da doença que é particularmente evidente nos casos com início tardio da doença. Até hoje, o único factor de risco com resultados com boa replicação é o alelo e4 da apolipoproteína E. É estimado que a ApoE contribua entre 30 a 70% para a variância genética total da DA [240]. Assim, uma larga proporção da variância genética nesta doença está por ser determinada em *loci* ainda desconhecidos. Tem sido sugerida a existência de pelo menos quatro *loci* adicionais com um efeito igual ou superior ao da ApoE [241].

Existem inúmeros estudos que descrevem associações positivas na DA esporádica. A metodologia dominante centrou-se na utilização de polimorfismos em genes candidatos de vias biológicas assumidas como envolvidas na patogénese da doença.

O estudo do genoma humano revelou que aproximadamente 99,9% da sequência de DNA é idêntica entre quaisquer dois indivíduos escolhidos aleatoriamente. Os 0,1% restantes representam regiões polimórficas que diferem entre indivíduos e ocorrem a uma frequência de pelo menos 1% [242]. Os polimorfismos de um único nucleótido (ou *Single Nucleotide Polymorphisms* – SNP) consistem na substituição de um único par de nucleótidos e são a forma mais abundante de variação genética, ocorrendo com uma frequência de

aproximadamente 1 por cada 1000 pares de bases [243]. Normalmente os SNP, por si só, não causam doença, no entanto podem predispor para a ocorrência de determinada situação patológica, podem modificar a extensão ou severidade da doença, ou podem também influenciar a resposta a determinados fármacos, influenciando assim a eficácia do tratamento [244].

Para além da ApoE foram encontradas associações significativas com a  $\alpha$ -2-macroglobulina (A2M), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), enzima convertora da angiotensina (DCP1), sintetase do óxido nítrico (NOS3), butirilcolinesterase (BchE), Fe65, catepsina D, etc. [245].

#### 3.3.4.1 Apolipoproteína E

Enquanto as mutações autossómicas dominantes nos genes da APP e pré-senilinas são causas muito pouco frequentes da DA, representando em conjunto cerca de 70% dos casos de DA de início precoce, a descoberta de que o alelo e4 da apolipoproteína E predisponha para a doença forneceu um factor de risco de elevada importância para a DA com o início tardio típico [246].

Hoje em dia o factor de risco genético para DA mais importante é a presença do alelo E4 da apolipoproteína (ApoE). Esta é uma proteína codificada por um gene situado no cromossoma 19. Os três alelos E2, E3 e E4 determinam o polimorfismo que conduz à ocorrência de seis fenótipos, E2/2, E3/3 e E4/4, em homozigotia e E2/3, E2/4 e E3/4 em heterozigotia. O fenótipo mais comum é o E3/3. A frequência alélica do ApoE E4 é de aproximadamente 15% em controlos, mas em doentes de Alzheimer esta frequência pode atingir os 36%. O genótipo ApoE4/4 em homozigotia, está presente em cerca de 2 a 3% da população em geral e em cerca de 12 a 15% de doentes de Alzheimer [247, 248]. Este alelo tem sido associado com as formas familiares e esporádicas de início tardio em ambos os sexos e em todos os grupos étnicos [248]. Os indivíduos que possuem este alelo têm 1,4 a 2,9 vezes maior risco de se tornarem cognitivamente afectados, quando comparados com indivíduos homozigóticos para o alelo E3. Os indivíduos homozigóticos para o alelo E4 podem ter um risco de desenvolver um defeito cognitivo 15 vezes superior quando comparados com indivíduos homozigóticos para o alelo E3 [249, 250]. Hoje em dia é um

dado adquirido que a presença do alelo E4 faz diminuir a idade de início da DA existindo, no entanto, muitos indivíduos homozigóticos para este alelo que permanecem cognitivamente saudáveis em idades avançadas [248, 251, 252]. Este alelo parece não ter qualquer efeito na progressão da doença [252]. A relação entre o alelo E2 e a DA ainda não é clara, tendo sido sugerido que este alelo possa ser protector contra a doença [248, 253].

A ApoE que existe em circulação é principalmente sintetizada no fígado e está associada a lipoproteínas, mas possivelmente os astrócitos e a microglia são fontes importantes de ApoE no cérebro [254, 255]. Esta proteína tem uma importante função como reguladora do metabolismo lipídico durante o desenvolvimento e está envolvida no crescimento e regeneração dos neurónios danificados [256]. Os níveis de ApoE aumentam após lesões cerebrais, o que pode contribuir para a regeneração dos neurónios [257]. Os mecanismos pelos quais o alelo E4 influencia o desenvolvimento da DA é ainda pouco claro, mas muitos estudos têm revelado efeitos de isoformas específicas na neurodegeneração, formação de TNF e  $\beta$ -amilóide. Arendt *et al* demonstraram que as respostas de plasticidade no cérebro estão diminuídas nos indivíduos que possuem o alelo E4 e estudos *in vitro* demonstraram que a apoE3 promove o crescimento de neurites numa extensão maior que a apoE4 [258]. Os indivíduos que possuem o alelo E4 têm também uma astrogliose mais severa, quando comparados com indivíduos que não possuem este alelo [259]. Esta proteína tem também um papel no desenvolvimento das patologias neurofibrilares e amilóides. A ApoE3 liga-se avidamente a proteínas associadas aos microtúbulos e promove a sua polimerização, enquanto ApoE4 despolimeriza estes mesmos microtúbulos [260]. O efeito estabilizador da ApoE3 pode prevenir a fosforilação anormal da proteína tau. Dados obtidos *in vitro* em estudos neuropatológicos mostram que o alelo E4 está associado ao aumento da densidade das TNF no cérebro [260]. Por outro lado, a ApoE liga-se fortemente às placas amilóides. Estudos *in vitro* indicam que a ApoE4 promove enquanto a ApoE3 inibe, a agregação da  $\beta$ -amilóide [261].

A acumulação de  $\beta$ -amilóide no cérebro está aumentada em controlos e em doentes de Alzheimer que possuem o alelo E4 [252, 262]. Este efeito pode basear-se no aumento da deposição de A $\beta$ 40. Contrariamente, os doentes de Alzheimer que possuem o alelo E2 têm uma diminuição dos depósitos de amilóide [263].

Nos testes neuropsicológicos, o alelo E4 tem sido associado com o declínio cognitivo em indivíduos com defeito cognitivo, mas não em sujeitos cognitivamente normais [264].

Apesar da forte associação entre a DA e o alelo E4 da ApoE, o genótipo da ApoE não é recomendado no diagnóstico de rotina desta doença. A presença do alelo E4 por si só não confirma a DA e a doença não pode ser excluída se um indivíduo não possuir este alelo de risco. Hyman *et al* reportaram num estudo baseado na população, que mais de metade dos indivíduos com idades superiores a 80 anos que possuíam dois alelos E4 eram cognitivamente saudáveis. Assim, a genotipagem da ApoE providencia apenas um aumento marginal na confiança do diagnóstico e não pode ser usada como um teste de diagnóstico para a DA [250, 265].

### 3.4. Stresse Oxidativo

#### 3.4.1. Conceito de Stresse Oxidativo e Espécies Reactivas de Oxigénio

De uma forma muito genérica o stresse oxidativo está descrito como a desregulação do equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de nitrogénio (RNS). Assim, o stresse oxidativo refere-se a um estado no qual os radicais livres e os seus produtos se encontram em excesso quando comparados com os níveis de defesas antioxidantes. Este desequilíbrio pode ocorrer como resultado do aumento da produção de radicais livres ou da diminuição das defesas antioxidantes [266].

Os radicais livres definem-se como qualquer átomo ou molécula que possui um ou mais electrões desemparelhados na sua orbital mais externa. Alguns são produtos normais do metabolismo celular, sendo que as espécies radicalares celulares predominantes são o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Outras moléculas tais como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), apesar de não serem radicais livres, podem levar à formação destas espécies através de várias reacções químicas [267]. Assim, a redução do oxigénio molecular a água é a maior fonte de radicais, sendo esta produção proporcional ao consumo de oxigénio. A etapa inicial nesta reacção envolve o radical superóxido o qual produz peróxido de hidrogénio por adição de um electrão. A redução do peróxido de hidrogénio leva à formação do radical hidroxilo altamente reactivo. No seu conjunto, estas moléculas são denominadas espécies reactivas de oxigénio, definição que enquadra o significado das suas capacidades de conduzir a alterações oxidativas a nível da célula



[268]. Para além destas, várias moléculas reactivas de nitrogénio, óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) são também importantes moduladores do stresse oxidativo. O peroxinitrito formado pela reacção do óxido nítrico com o superóxido é uma molécula altamente reactiva que também se quebra para dar origem a  $\text{OH}^*$  [269].

O stresse oxidativo pode causar dano celular e as ROS oxidam componentes celulares críticos como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos alterando a sua estrutura e função, induzindo apoptose ou necrose [270].

Vários factores contribuem para uma maior susceptibilidade do cérebro ao stresse oxidativo. O tecido cerebral possui um elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, para além disso tem uma taxa de consumo de oxigénio extremamente elevada e, por último, não possui defesas antioxidantes fortes [155, 271].

#### *3.4.2. Defesas antioxidantes*

Com o objectivo de evitar os danos causados pelas ROS, tais como quebras nas cadeias de DNA, peroxidação lipídica e modificações proteicas, durante a evolução têm sido desenvolvidos mecanismos que previnem a geração de ROS ou que promovem a sua eliminação. Por exemplo, a remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de anião superóxido previne a formação de radicais hidroxilo altamente reactivos e citotóxicos [272]. Existe um grande número de compostos anti-oxidantes, mas apenas alguns foram formalmente estudados em ensaios clínicos. A eficácia destes agentes pode ser melhorada pela administração combinada com outros anti-oxidantes ou fármacos com efeitos neuroprotectores diferentes. Por exemplo, a vitamina C pode ajudar à reposição de vitamina E, logo estas duas vitaminas anti-oxidantes são, normalmente, co-administradas [267].

### **Defesas anti-oxidantes enzimáticas**

#### **Ciclo do glutatião**

O glutatião (GSH) tem funções antioxidantes, é um transporte e uma forma de armazenamento da cisteína, é um parceiro de reacção para a destoxificação xenobiótica e é um cofactor em reacções de isomerização. O sistema do glutatião é especialmente importante na defesa celular contra ROS, uma vez que esta molécula reage directamente

com os radicais em reacções não enzimáticas. Para além disto o glutatião é também dador de electrões nas reduções de peróxidos catalizadas pela peroxidase do glutatião (GIPx). O produto da oxidação do GSH é o glutatião dissulfido (GSSG). A partir deste o GSH é regenerado dentro das células numa reacção catalizada pela flavoenzima redutase do glutatião (GIRed). Esta enzima regenera o GSH através da transferência de equivalentes de redução do NADPH para o GSSG [273].

Durante as reacções catalisadas pela GIPx e pela GIRed, o glutatião reduzido é regenerado. Pelo contrário, o GSH é consumido durante a geração de glutatião-S-conjugados pela glutatião-S-transferase ou pela libertação de glutatião das células. Ambos os processos fazem baixar os níveis de glutatião total intracelular. Logo, para ser mantida a concentração intracelular de GSH, o GSH consumido tem de ser repostado por síntese a partir dos seus aminoácidos constituintes [272].

### **Superóxido Dismutase (SOD)**

Outro mecanismo de defesa antioxidante envolve a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta enzima transforma o ião superóxido, um radical livre extremamente reactivo, em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Embora através desta reacção seja formado peróxido de hidrogénio, este é menos citotóxico que o anião superóxido.

Existem três isoformas da SOD identificadas em mamíferos que são caracterizadas pelo ião metálico do seu grupo prostético e pela sua localização celular. A isoenzima expressa mais ubiquamente contém cobre e zinco (CuZnSOD ou SOD1) e é formada por um dímero que contém 153 aminoácidos existente no compartimento intracelular. A isoforma indutível da SOD que contém manganésio (Mn-SOD ou SOD2) localiza-se na mitocôndria e possui 24 kD. A terceira isoforma possui como grupos prostéticos átomos de cobre e zinco (SOD3) e localiza-se no compartimento extracelular.

As SOD1 e 2 estão distribuídas de formas diferentes nas células neuronais e gliais. A SOD1 está localizada maioritariamente nos astrócitos em todo o SNC, mas também é detectável em neurónios, embora em menor quantidade. Por outro lado, a SOD2 localiza-se predominantemente nos neurónios cerebrais e na espinhal medula [274]. A imunorreactividade de ambas as enzimas é extremamente baixa, em condições fisiológicas normais, nas células da microglia, oligodendrócitos e células endoteliais, o que pode explicar o facto da oligodendroglia ser particularmente vulnerável ao stresse oxidativo

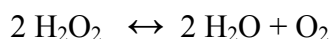
[275]. Ao contrário dos neurónios, os astrócitos conseguem aumentar a expressão da glutatíon peroxidase combatendo assim o dano oxidativo [276].

A relação destas enzimas com a doença de Alzheimer tem sido bastante discutida, principalmente devido ao facto de vários estudos da actividade da SOD terem obtido resultados contraditórios. Por outro lado a imunorreactividade da SOD1 e da SOD2, assim como da catalase apresenta-se significativamente aumentada nas regiões onde ocorrem tranças neurofibrilares e placas senis [277, 278].

### **Catalase**

A enzima catalase é outro dos componentes do mecanismo de defesa antioxidante. Esta enzima decompõe peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, complementando desta forma a acção antioxidante da SOD.

É constituída por quatro subunidades, cada uma delas com um grupo heme no local activo, que catalisa a reacção:



Compartimentada nos peroxissomas, existe em grande quantidade no fígado e glóbulos vermelhos, mas o cérebro, coração e músculo-esquelético mostram baixa actividade desta enzima [279].

### **Defesas anti-oxidantes não enzimáticas**

A vitamina A (retinol) é um antioxidante lipossolúvel derivado de carotenóides obtidos através da dieta. Em 1989, Jeandel *et al* [280] evidenciaram que a concentração desta vitamina no soro se encontrava abaixo dos níveis normais em doentes de Alzheimer. Da mesma forma, outros investigadores descreveram resultados semelhantes [281, 282].

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é também um anti-oxidante lipossolúvel, no entanto, o seu mecanismo de actuação envolve a sua incorporação na região hidrofóbica das biomembranas e, através da cedência de átomos de hidrogénio, interrompe reacções de peroxidação lipídica, protege os neurónios da toxicidade da  $\beta$ -amilóide e capta radicais livres [283, 284]. Existem algumas evidências que apontam no sentido do metabolismo da Vitamina E se encontrar alterado em doentes de Alzheimer. No mesmo estudo anteriormente referido [280], foram descritas concentrações séricas diminuídas de vitamina

E em doentes de Alzheimer quando comparados com indivíduos saudáveis.

A vitamina C (ácido ascórbico) é um anti-oxidante hidrossolúvel, importante no processo de regeneração da forma activa da vitamina E [285]. Para além disso, participa na remoção de espécies reactivas como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  e hidroperóxidos lipídicos. Pode ainda estabilizar as catecolaminas, impedindo a formação de ROS [286].

O ácido úrico é um produto final do metabolismo das purinas que se encontra a nível do plasma e que também possui propriedades anti-oxidantes uma vez que remove, quando em concentrações fisiológicas, radicais superóxido e hidroxilo, reduzindo também a formação de peroxinitrito [287].

### *3.4.3. Doença de Alzheimer e Stresse Oxidativo*

Uma década de investigação estabeleceu que as espécies reactivas de oxigénio contribuem extensivamente para o dano neuronal na DA, sendo o dano oxidativo provavelmente um dos primeiros marcadores de disfunção neuronal nesta patologia. Com o avanço da idade, existe uma produção aumentada de ROS e uma diminuição da capacidade antioxidante, o que conduz a um ambiente celular de oxidação [267].

É conhecido que existe uma forte correlação entre a intensidade da produção de radicais livres pela  $A\beta$  e a neurotoxicidade. Adicionalmente aos seus efeitos directos de neurotoxicidade, a  $A\beta$  pode também ser clivada em peptídeos com características radiculares (contendo 25-35 aa) que actuam como potentes iniciadores da peroxidação lipídica. Paralelamente, a  $A\beta$  pode activar a resposta inflamatória através do aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6, pelas células da microglia e pode também iniciar a produção de ROS, intermediários nitrogenados e TNF- $\beta$  por parte destas células. O peptídeo  $\beta$  amilóide pode ter uma acção pró-oxidante e, por acção de metais como o cobre e o zinco, levar à formação de  $H_2O_2$  e do radical hidroxilo, induzindo peroxidação lipídica e, eventualmente, morte celular [288]. Assim, a toxicidade da  $A\beta$  ocorre por meio de vários mecanismos diferentes, dos quais o dano induzido por radicais livres parece ser o mais proeminente [289, 290].

Nos doentes de Alzheimer tem sido descrito um défice da actividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, não só a nível cerebral, mas também em plaquetas

isoladas de sangue periférico. Este compromisso da cadeia respiratória e a consequente alteração da fosforilação oxidativa estão associados à falência energética (baixos níveis de ATP) e ao aumento de espécies reactivas de oxigénio [277]. O facto de ser possível identificar a disfunção mitocondrial em células periféricas, as plaquetas, tem permitido encarar esta doença como uma doença sistémica e procurar identificar biomarcadores periféricos da doença que permitam esclarecer o envolvimento da mitocôndria na presença de neurodegenerescência.

Uma questão importante que se coloca é se a diminuição do stresse oxidativo tem algum valor terapêutico na minimização da patogénese da DA. Foi demonstrado que agentes que inibem a formação de radicais livres também reduzem a incidência e progressão da doença. A adição de antioxidantes tais como o propilgalato, a vitamina E e de *spin traps* como a N-tert-butil- $\beta$ -fenilnitrona reduzem a neurotoxicidade em células em cultura expostas a A $\beta$ . Para além disso, a vitamina E promove a sobrevivência neuronal no hipocampo e permite a reposição de neurónios colinérgicos hipofuncionantes em ratos [270, 291]. Contudo, em estudos *post-mortem* usando tecido cerebral, tem sido difícil demonstrar inequivocamente se o stresse oxidativo tem um papel primário na neurodegeneração ou se é um epifenómeno secundário.

Têm sido observados níveis elevados de modificações oxidativas nos nucleótidos e nas proteínas. Recentemente, foi sugerido que esta forma de dano neuronal pode preceder o desenvolvimento das placas senis em humanos e em ratos transgénicos. O stresse oxidativo ao promover a oxidação de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos pode interferir com a actividade das enzimas celulares e perturbar as funções normais das células. A acumulação gradual de dano oxidativo ao longo do tempo em neurónios pós-mitóticos pode conduzir à ocorrência do início da doença em idade avançada, bem como ao declínio progressivo e gradual observado na DA [292].

No cérebro de doentes de Alzheimer ocorre um aumento da peroxidação lipídica, sendo este mais evidente nos locais onde ocorrem as alterações degenerativas [155]. Os fosfolípidos que compõem as membranas contêm ácidos gordos polinsaturados, os quais são especialmente vulneráveis ao ataque dos radicais livres devido ao facto das suas ligações duplas permitirem a fácil remoção de iões hidrogénio. A oxidação destes ácidos gordos produz aldeídos como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o malonildialdeído (MDA). O primeiro caracteriza-se por ser uma substância altamente reactiva e citotóxica, capaz de

inibir a glicólise, a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, bem como a degradação proteica. Provoca a degeneração e morte de neurónios do hipocampo em cultura por comprometer a actividade das ATPases, induzindo alterações membranares e perda da homeostasia do cálcio nas células [293]. A administração de HNE no cérebro de ratos provoca um dano nos neurónios colinérgicos, uma diminuição da actividade da colina-acetil-transferase e um comprometimento da memória visuo-espacial [294]. Os níveis de HNE encontram-se aumentados em múltiplas regiões cerebrais obtidas de autópsias, no LCR de indivíduos com DA, encontrando-se também aductos deste aldeído nas TNF. As glutatíon transferases, um grupo de enzimas que inactiva os produtos tóxicos do metabolismo do oxigénio, incluindo o HNE, encontram-se marcadamente diminuídas em múltiplas regiões cerebrais bem como no LCR de doentes com DA, sugerindo uma perda de protecção contra o HNE [293].

O malonildialdeído (MDA), é um dos marcadores periféricos mais utilizados para determinar dano causado por radicais livres, apresentando concentrações aumentadas no envelhecimento normal e em indivíduos com DA [295, 296].

Para além da peroxidação lipídica, o dano oxidativo pode provocar alterações a nível das proteínas, levando à ocorrência de alterações dos aminoácidos constituintes dessas mesmas proteínas, a modificações das suas conformações ou à ruptura de ligações peptídicas. Vários estudos demonstraram um aumento dos grupos carbonilo em diversas regiões cerebrais de doentes de Alzheimer [297]. Estes grupos carbonilo resultam da fragmentação e oxidação de grupos amina, promovidas por metais e/ou radicais livres.

A agregação de proteínas em fibrilas é uma das características da DA. As modificações oxidativas podem provocar o *cross-linking* de ligações covalentes das proteínas, conduzindo à formação de fibrilas e à sua insolubilidade. Este pode também tornar as proteínas mais resistentes à remoção proteolítica, uma vez que o stress oxidativo inibe a actividade do proteassoma [155].

A tau, sendo uma proteína neuronal que se localiza principalmente a nível dos axónios, é particularmente susceptível ao *cross-linking* oxidativo que pode contribuir significativamente para a acumulação de conjugados de ubiquitina nas TNF, tendo sido registados níveis elevados desta proteína em várias doenças neurodegenerativas. Para além disto, a fosforilação está intimamente ligada ao stress oxidativo por intermédio da via das MAP cinases, através da activação do NFkB. Pode pois constatar-se que a oxidação está

potencialmente relacionada com a fosforilação das proteínas tau. O papel do dano oxidativo na formação das TNF é suportado pela presença de grupos carbonilo proteicos, de nitrotirosina (um marcador do radical peroxinitrito), de HNE, de produtos de glicosilação avançada e de hemeoxigenase-1 (uma enzima com alguma capacidade antioxidante) nas TNF [155].

A oxidação do DNA pode produzir rupturas nas cadeias deste ácido nucleico, troca entre cromátídeos, *cross-linking* de DNA-proteínas e modificações na sequência de bases. O dano no DNA, acumulado nas células que não se dividem, pode desempenhar um papel extremamente importante nas alterações associadas ao envelhecimento. Vários estudos demonstraram um aumento do dano oxidativo do DNA no cérebro de indivíduos com DA [298].

O aducto de DNA melhor descrito é a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), a qual se encontra aumentada em fracções mitocondriais e nucleares de doentes com DA. Foram também observadas elevações dos níveis de 5-hidroxiuracilo, 8-hidroxiadenina e 5-hidroxicitosina. O padrão de dano de bases múltiplas é provavelmente devido ao ataque do radical hidroxilo ao DNA [299].

## OBJECTIVOS DO ESTUDO

Nos últimos anos a investigação na área da doença de Alzheimer tem tido inúmeros e enormes progressos. Contudo, ainda não existem biomarcadores que identifiquem inequivocamente esta doença. Os mecanismos de morte celular e neuronal patentes na DA estão associados com diversos factores como o stresse oxidativo e falência energética mitocondrial, factores imunológicos e inflamatórios e factores genéticos, entre outros. O estudo de doentes com DCL, uma situação de interface entre o envelhecimento e a demência, contribuirá por certo para consolidar hipóteses e evidências associadas a esta doença, definir o enquadramento temporal destas alterações na fisiopatologia complexa e multifactorial da demência e, eventualmente, identificar agentes de iniciação ou aceleração do processo degenerativo. Assim, a caracterização fisiopatológica e etiopatogénica da doença de Alzheimer, mas também do Defeito Cognitivo Ligeiro, com o fim último de identificar marcadores biológicos e preditores de demenciação é, sem dúvida, um campo extremamente importante para o avanço do conhecimento e reconhecimento destas patologias.

### *Especificação dos objectivos do estudo:*

- Caracterizar o Defeito Cognitivo Ligeiro e a doença de Alzheimer em estadio ligeiro em termos de parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de expressão de proteínas de morte celular, a nível periférico.
- Identificar marcadores biológicos por comparação destes com os valores apresentados por indivíduos controlo.
- Encontrar preditores de prognóstico da conversão do estadio de DCL para DA
- Identificar factores de risco genéticos associados com mediadores inflamatórios, na população portuguesa.



## DESENHO DO ESTUDO

Este estudo envolveu duas análises globalmente diferentes. Por um lado foram analisados parâmetros de stresse oxidativo, inflamatórios e de morte celular; por outro lado, foi realizado um estudo genético com vista à determinação de eventuais factores de risco para o desenvolvimento da doença.

### ***1. Estudo dos parâmetros de stresse oxidativo, inflamatórios e de morte celular***

Este estudo foi constituído por duas fases:

- **Primeira fase:** Estudo transversal (comparativo) entre os três grupos (doentes de Alzheimer, indivíduos com DCL e indivíduos controlo), que envolveu a elaboração da história clínica, estudo neuropsicológico, estudo de imagem e estudo laboratorial com a determinação de parâmetros de stresse oxidativo, inflamatórios e de morte celular;

- **Segunda fase:** Estudo prospectivo longitudinal com a duração de 12 meses e limitado ao grupo DCL que envolveu três avaliações clínicas, aos 3, 6 e 12 meses, com estudo específico para confirmar uma eventual mudança de categoria diagnóstica (DCL para demência) e estudo laboratorial de parâmetros inflamatórios e de morte celular.

### ***2. Estudo genético***

Foram realizados estudos genéticos de associação (casos vs controlos) na população em estudo, o que permitiu comparar as frequências de determinados alelos e/ou genótipos entre grupos de indivíduos com doença de Alzheimer (DA) e defeito cognitivo ligeiro (DCL) e indivíduos saudáveis (controlos). Foram analisados alguns polimorfismos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  e foi feita a genotipagem da apolipoproteína E. Espera-se, com este estudo, conseguir associar as variantes genéticas ligadas à susceptibilidade de desenvolver a patologia, a um risco aumentado de doença.

## METODOLOGIA

### ***1. População em estudo***

A selecção e caracterização clínica dos indivíduos participantes neste estudo foram feitas no Serviço de Neurologia II dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) pela equipa médica respectiva, entre Junho de 2003 e Setembro de 2003. Foram seleccionados consecutivamente, indivíduos caucasianos, que frequentaram a consulta de Demências deste mesmo hospital.

#### **1.1. Selecção e caracterização da população para o estudo dos parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de morte celular**

O estudo dos parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de morte celular foi realizado em três grupos distintos:

**Grupo DCL** – constituído por 45 indivíduos com defeito cognitivo ligeiro (DCL), avaliados segundo os critérios de classificação e diagnóstico propostos por Petersen [67].

**Grupo DA** – constituído por 35 indivíduos com doença de Alzheimer (DA) provável de acordo com os critérios preconizados pela DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4ª Edição) e NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*); classificação em estadio ligeiro de acordo com a escala de estadiamento global CDR (*Clinical Dementia Rating*) [1, 4, 300].

**Grupo controlo** – constituído por 25 indivíduos saudáveis, com idades semelhantes aos indivíduos dos grupos DCL e DA, sem doença neurológica e com parâmetros biológicos conhecidos e em base de dados do Laboratório de Neuroquímica dos HUC.

Tabela II- Características demográficas dos indivíduos envolvidos no estudo dos parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de morte celular.

Grupo	n	Média de Idades (anos)	Média de Idades de Início (anos)	Sexo	
				F	M
<b>DA</b>	35	71 ± 7,6	67,4 ± 9,0	16 (45,7%)	19 (54,3%)
<b>DCL</b>	45	70,7 ± 8,6	68 ± 78,0	26 (57,8%)	19 (42,2%)
<b>Controlo</b>	25	69,1 ± 8,3	-	19 (76%)	6 (24%)

## 1.2. Selecção e caracterização da população para o estudo genético

O estudo genético foi realizado em 197 doentes de Alzheimer, 55 indivíduos com DCL e 126 controlos. Os indivíduos foram seleccionados consecutivamente, pela equipa médica, da população observada no Serviço de Neurologia II dos HUC entre Junho de 2003 e Setembro de 2004. Foram utilizados para esta selecção os critérios atrás descritos.

Tabela III- Características demográficas dos indivíduos envolvidos no estudo genético.

Grupo	n	Média de Idades (anos)	Média de Idades de Início (anos)	Sexo	
				F	M
<b>DA</b>	197	69,5	65,9	126 (64%)	71 (36%)
<b>DA ≥ 65</b>	131	74,8 ± 5,0	71,8 ± 4,8	79 (60,3%)	52 (39,7%)
<b>DA &lt; 65</b>	65	59,0 ± 6,4	55,0 ± 6,0	47 (72,3%)	18 (27,7%)
<b>DCL</b>	55	69,5 ± 9,6	67,5 ± 9,4	32 (58,2%)	23 (41,8%)
<b>Controlo</b>	98	74,0 ± 6,9	-	67 (68,4%)	31 (31,6%)

DA – Doença de Alzheimer; DA ≥ 65 – grupo de doentes de Alzheimer com início da doença aos 65 anos ou mais tarde; DA<65 - grupo de doentes de Alzheimer com início da doença antes dos 65 anos de idade; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

Todos os indivíduos participantes nestes estudos tomaram conhecimento dos mesmos, do tipo de resultados esperados e assinaram um consentimento informado. Este consentimento foi também assinado por um cuidador ou membro da família.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra, tendo sido mantido o sigilo dos dados relativos a todos os participantes.

## **2. Colheita e preparação do material biológico**

### **2.1. Parâmetros de stresse oxidativo**

Para avaliação dos parâmetros de stresse oxidativo foi colhida uma amostra de 10 ml de sangue por punção venosa, para um tubo de polipropileno contendo heparina e outra amostra de 10 ml de sangue venoso para um tubo com ACD 3,8%.

O sangue colhido com heparina foi submetido a uma centrifugação a 1000 rpm, a 4°C durante 15 minutos para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP).

A fracção de eritrócitos (sedimento da centrifugação anterior) foi lavada três vezes com soro fisiológico (NaCl 0,9%), por centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C.

O concentrado eritrocitário foi dividido em cinco alíquotas para determinação de vitamina E, malonildialdeído (MDA), glutatião reduzido e oxidado (GSH e GSSG) e actividades das enzimas glutatião redutase (Gired) e glutatião peroxidase (Glp<sub>x</sub>), sendo estas alíquotas posteriormente congeladas a -70°C.

O PRP, recolhido em tubo de plástico, foi novamente centrifugado a 1000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente para completa remoção de eritrócitos e leucócitos residuais e, em seguida, centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente para evitar agregação plaquetar. O sobrenadante obtido foi aliquoteado e congelado a -70°C para a determinação das concentrações plasmáticas de ácido úrico, proteínas, colesterol total, GSH e GSSG, grupos carbonilo, vitaminas A e E e capacidade antioxidante total (TAS).

Ao sangue colhido com ACD foi feita uma centrifugação a 900 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. O plasma rico em plaquetas foi recolhido, adicionaram-se 100 µl de ACD 3,8% por ml de plasma e foi feita nova centrifugação a 900 rpm, durante 15 minutos à temperatura ambiente. O PRP foi novamente recolhido e centrifugado a 2500 rpm, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Foi recolhida uma amostra de 1 ml de sobrenadante desta última centrifugação que foi submetida a filtração por centrifugação a 9000 rpm, durante 1 hora a 4°C. O filtrado resultante foi congelado a -70°C e posteriormente processado.

O precipitado plaquetar foi lavado duas vezes com ACD diluído ½ e ressuspenderam-

se as plaquetas em 2 ml de ACD na mesma diluição com posterior divisão em duas frações. Uma destas frações (1 ml) foi submetida a estimulação com IL (4 ng/ml) e LPS (Lipopolissacarídeo; 200 µg/ml). De cada uma das suspensões plaquetares (com e sem estimulação) foram separados 500 µl para determinação dos níveis de nitratos e nitritos, e congelados a -70°C para posterior processamento.

#### *2.1.1. Determinação da concentração de proteínas totais*

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada segundo o método do biureto (Randox Laboratories). Neste método os íons cobre, presentes no meio alcalino, reagem com as ligações peptídicas resultando na formação de um complexo corado. A 50 µl de soro foram adicionados 2,5 ml de reagente de biureto, a mistura é homogeneizada no vórtex e deixada a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. De seguida, a leitura da densidade óptica foi efectuada num espectrofotómetro (Shimadzu UV-120-02) e os valores obtidos para o padrão fornecido no kit foram comparados com os das amostras. Os resultados são expressos em g/l.

#### *2.1.2. Quantificação de hemoglobina na suspensão de eritrócitos*

A 20 µl da suspensão de eritrócitos, foram adicionados 5 ml de reagente de Drabkins (Sigma Diagnostics). Após agitação no vórtex e dez minutos de incubação à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da densidade óptica num espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02. Por comparação com um padrão de hemoglobina 100 g/l (Sigma) calculou-se a concentração de hemoglobina na amostra, sendo os resultados expressos em g/l.

### **2.2. Parâmetros inflamatórios**

Para a determinação de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos, por citometria de fluxo, foi colhida uma amostra de 10 ml de sangue por punção venosa, para um tubo de polipropileno com heparina.

### 2.3. Parâmetros de morte celular

Para a avaliação da expressão das proteínas Bax, Bcl2, Fas e FasL nas células sanguíneas por citometria de fluxo, foi colhida uma amostra de 3 ml de sangue por punção venosa para um tubo com EDTA (Etileno-diamina-tetra-acetato).

### 2.4. Estudo genético

Para o estudo genético foram colhidos, a cada indivíduo, 6 ml de sangue por punção venosa para dois tubos com EDTA.

O DNA foi extraído recorrendo a um kit (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*; Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), que se baseia na destruição das células nucleadas, precipitação proteica e posterior precipitação do DNA por adição de etanol. Este método permitiu obter aproximadamente 600 µl de solução de DNA com concentrações entre os 700 e 1300 µg/µl e grau de pureza próximo de 1,8 (determinação espectrofotométrica).

### **3. Parâmetros de stresse oxidativo**

#### **3.1. Determinação dos níveis de antioxidantes não enzimáticos**

##### *3.1.1. Ácido úrico plasmático*

O método enzimático colorimétrico utilizado para a quantificação do ácido úrico no plasma é comercializado pela Randox e baseia-se na redução do ácido úrico a alantoína por acção da enzima uricase, com libertação de peróxido de hidrogénio. A quantidade de  $H_2O_2$  formada, proporcional ao teor em ácido úrico, é então avaliada espectrofotometricamente pela formação de um composto corado.

Assim, adicionou-se a 10  $\mu$ l de plasma 1 ml de tampão fosfato contendo ácido dimetil-amino-benzóico (DMAB) 1 mM, peroxidase  $\geq 1000$  U/ml, uricase  $\geq 40$  U/ml, 4-aminoantipirina 0,05 mM e azida de sódio 0,1 g/L como conservante. Após homogeneização e incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente procedeu-se à leitura da absorvância a 550 nm, usando como branco o próprio reagente, num espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02. Simultaneamente foi determinada a absorvância de um padrão comercial, contendo uma concentração conhecida de ácido úrico, fornecido com o kit, o que permitiu calcular a concentração de ácido úrico das amostras, bem como a do controlo ensaiado em simultâneo.

##### *3.1.2. Colesterol total*

O colesterol total plasmático foi quantificado por um método colorimétrico enzimático utilizando o kit comercializado pela Randox sob a designação de “Cholesterol – enzymatic colorimetric test CHOD-PAP”.

Realizaram-se os ensaios padrão, controlo, branco e amostra, pipetando para os respectivos tubos 10  $\mu$ l de solução padrão, controlo,  $H_2O$  e plasma. Adicionou-se 1 ml do tampão que contém colesterol esterase 0,16 U/ml, colesterol oxidase 0,11 U/ml, peroxidase 5,5 U/ml, fenol 25 mM e 4-amino antitripirina 0,25 mM. Homogeneizou-se e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente.

O colesterol e os ésteres de colesterol são libertados das lipoproteínas e, por acção da



colesterol esterase são hidrolisados. As colesterol oxidase e peroxidase contidas no reagente vão originar a formação de peróxido de hidrogénio e do subsequente composto corado cuja absorvância é mensurável ao comprimento de onda de 505 nm. A leitura foi realizada num espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02 e foi calculada a concentração plasmática de colesterol das amostras e do controlo.

### 3.1.3. Glutatião reduzido (GSH) e oxidado (GSSG)

Para a determinação dos níveis plasmáticos e eritrocitários de GSH e GSSG, foi utilizado um método fluorimétrico que usa o o-ftaladeído (OPT) como reagente fluorescente e a N-etilmaleimida (NEM) como bloqueador da forma reduzida do glutatião, impedindo a sua participação no ensaio enzimático [301, 302].

Assim, para a determinação de GSH, juntaram-se num tubo de ensaio 100 µl do sobrenadante anteriormente obtido/padrão, 1,8 ml de tampão e 100 µl de OPT (1 mg/ml). Incubaram-se as soluções à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Para a determinação de GSSG, num tubo de ensaio juntaram-se 500 µl de sobrenadante e 200 µl de NEM (0,04M) e incubaram-se as soluções à temperatura ambiente durante 30 minutos. No final deste tempo retiraram-se 140 µl da solução anterior/padrão e juntaram-se 1,76 ml de hidróxido de sódio (0,1 M) e 100 µl de OPT.

A fluorescência foi medida ao comprimento de onda de 420 nm sob excitação a 350 nm, durante 5 segundos.

A incubação da GSH/GSSG com NEM (potente inibidor da glutatião redutase) impede a formação do fluoróforo após a adição do OPT. A determinação de GSH é efectuada a pH inferior a 8 (tampão fosfato-EDTA). Acima de pH 10 a GSH é parcialmente oxidada, sendo a determinação de GSSG efectuada a pH 12. Aqui o valor de pH não é tão crítico, não devendo contudo baixar de 10.

O glutatião reage especificamente com o OPT (outros aminoácidos reagem muito pouco sob estas condições), a pH=8, formando um produto altamente fluorescente que activado a 350 nm emite um pico a 420 nm.

A intensidade de fluorescência do produto OPT-GSH ou OPT-GSSG é directamente proporcional às concentrações de GSH ou GSSG, sendo a correlação linear para valores entre 10 ng–2 µg e 5 ng–2 µg, respectivamente.

### 3.1.4. Vitaminas A e E plasmáticas

O doseamento destas duas vitaminas foi realizado por HPLC em fase reversa pelo método descrito por Milne em 1986 e modificado por Zaman em 1993 [282, 303, 304].

O primeiro passo desta determinação consiste na desproteinização e extracção da fracção lipídica da amostra. Para isso misturaram-se 200 µl de plasma com 200 µl de solução I (etanol/n-hexano contendo 1,2 mg/L de  $\delta$ -tocoferol como padrão interno) fornecida pela BioRad no kit “Vitamin A/E by HPLC”. Homogeneizou-se durante um minuto no vórtex.

Para se efectuar a separação de fases foram adicionados 200 µl da solução II (sulfato de amónio 100 mM em metanol). Após agitação durante 1 minuto em vórtex, centrifugou-se a 5000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante límpido foi recolhido e utilizado no processo cromatográfico. Assim, foram injectados 20 µl de amostra no sistema HPLC equipado com coluna analítica Spherisorb ODS 1-5 µm, 250x4,6 mm e detector UV/Visível. A separação cromatográfica ocorreu em sistema isocrático a 45°C por eluição com solução aquosa de metanol a 90%, ao fluxo de 2,5 ml/min.

A detecção espectrofotométrica da vitamina A foi feita ao comprimento de onda de 340 nm e, decorridos 3 minutos, o selector de comprimentos de onda foi comutado para 295 nm, sendo então detectado o padrão interno e a vitamina E.

A quantificação pode então ser efectuada por avaliação da altura dos picos e a padronização feita com soluções contendo retinol e  $\alpha$ -tocoferol, sendo as concentrações plasmáticas de vitamina A e E expressas em µg/dl e µM, respectivamente.

### 3.1.5. Vitamina E eritrocitária

A fracção lipídica contendo vitamina E foi obtida pelo método descrito por Burton em 1985 [305]. A 500 µl de suspensão de eritrócitos, com concentração de hemoglobina previamente aferida a cerca de 100 g/L, foram adicionados 1,5 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 mM e 2 ml de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada no vórtex durante 1 minuto e novamente durante mais 3 minutos após a adição de 2 ml de n-hexano. O extracto foi então centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e 1 ml da fase superior (n-hexano) foi removido, evaporado à secura sob corrente de azoto e armazenado a -70°C sempre que o processamento não tenha sido imediato.

Este extracto lipídico foi retomado com 250 µl de n-hexano imediatamente antes de

ser analisado por HPLC em fase reversa. Foram injectados 20 µl de amostra, tendo o processo ocorrido em coluna Spherisorb S10 w (250x4,6 mm) eluída com n-hexano modificado com 0,9% de metanol a fluxo constante de 1,5 ml/minuto. A detecção espectrofotométrica ocorreu na gama dos ultravioletas a 287 nm.

A quantificação baseou-se na comparação das alturas dos picos da amostra e dos padrões obtidos com soluções de  $\alpha$ -tocoferol em n-hexano. Os níveis de vitamina E foram expressos em µmol/L e nmol/g hemoglobina.

### 3.1.6. Capacidade antioxidante total do plasma (TAS)

Para a avaliação da capacidade antioxidante do plasma foi utilizado um kit (Total Antioxidant Status) comercializado pela Randox. A metodologia baseia-se na capacidade plasmática de inibição da formação do catião radical  $ABTS^{+\bullet}$  (2,2'-azino-di[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) de cor azul-esverdeada, cuja absorvância é mensurável a 600 nm. Na presença de antioxidantes plasmáticos, a absorvância diminui proporcionalmente com a capacidade antioxidante do fluido.

Foram adicionados 20 µl de plasma a 1 ml de tampão fosfato 80 mM, pH 7,4, contendo metamioglobina 6,1 µM e ABTS 610 µM. Homogeneizou-se e mediu-se a absorvância inicial ( $A_i$ ) a 600 nm num espectrofotómetro UVIKON 933-UV/Vis (Kontron Instruments), termostatizado. Adicionaram-se de seguida 200 µl de substrato constituído por  $H_2O_2$  100 µM em tampão fosfato 48 mM, pH 7,4 e, após homogeneização, monitorizou-se a variação da absorvância ocorrida a 37°C durante 3 minutos.

Designando por  $A_f$  o valor da densidade óptica ao minuto 3, a variação de absorvância da amostra naquele período de tempo será  $\Delta A = A_f - A_i$ .

Foi efectuado um ensaio branco, substituindo o plasma por água ultra-pura, obtendo-se um valor de  $\Delta A_{branco}$ . O valor real de absorvância da amostra resulta da subtracção da  $\Delta A_{branco}$  à  $\Delta A_{plasma}$ .

Como padrão foi utilizada uma solução de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e os resultados expressos em unidades de actividade TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), convertidas em mmol de substâncias antioxidantes/L, uma vez que uma unidade TEAC se define como a concentração de Trolox com capacidade antioxidante equivalente a 0,1 mmol/L da substância solubilizada sob investigação.

## 3.2. Determinação dos níveis de antioxidantes enzimáticos

### 3.2.1. Peroxidase do Glutatião (GLPx)

A actividade enzimática da GLPx eritrocitária foi medida espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Wendel [306].

Este método utiliza o tert-butilhidroperóxido como substrato, sendo a formação de glutatião oxidado monitorizada por quantificação da oxidação do NADPH a  $\text{NADP}^+$  a um comprimento de onda de 340 nm.

O concentrado eritrocitário (0,5 ml) foi hemolisado com 9,5 ml de água ultra-pura e diluído na proporção 2:1 com uma solução contendo cianeto de potássio 4,5 mM, ferrocianeto de potássio 0,45 mM e dihidrogenofosfato de potássio 0,25 M.

Num banho a 37°C foram misturados 100 µl do hemolisado (0,33 mg de proteína) com 800 µl de mistura reaccional contendo fosfato de potássio 100 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, 0,24 U de glutatião redutase e NADPH 0,25 mM em hidrogenocarbonato de sódio 0,1%. A reacção foi iniciada por adição de tert-butilhidroperóxido 1,2 mM e a variação de absorvância registada durante 5 minutos num espectrofotómetro UVIKON 933-UV/Vis (Kontron Instruments), termostatizado.

A actividade enzimática da GLPx foi expressa em unidades internacionais de enzima por grama de hemoglobina (U/g Hb).

### 3.2.2. Redutase do Glutatião (Glred)

A actividade enzimática da Glred eritrocitária foi medida espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Goldberg [307].

O concentrado eritrocitário (0,5 ml; Hb aferida a 100 g/L) foi hemolisado com 500 µl de água ultra-pura. Foram diluídos 100 µl deste hemolisado com 900 µl de soro fisiológico.

Num tubo juntaram-se 2,6 ml de tampão fosfato 0,12 M; pH=7,2; 0,1 ml de EDTA 15 mM; 0,1 ml de GSSG 65,3 mM e 0,1 ml de plasma ou de água destilada (ensaio/branco). Fez-se uma incubação a 37°C durante 5 minutos, adicionando-se, no final da incubação, 50 µl de NADPH 9,6 mM. A oxidação do NADPH foi medida durante 2 minutos, a 37°C, num espectrofotómetro UVIKON 933-UV/Vis, termostatizado (Kontron Instruments) pela variação da absorvância ao comprimento de onda de 340 nm.

### 3.3. Marcadores de oxidação

#### 3.3.1. Malonildialdeído (MDA)

Os doseamentos plasmáticos e eritrocitários do malonildialdeído foram feitos por um método espectrofotométrico [308-311], cujo fundamento se baseia no facto da hidrólise dos lipoperóxidos a 100°C com ácido fosfórico provocar a libertação de malonildialdeído (MDA), que na presença de ácido tiobarbitúrico (TBA) origina complexos MDA-TBA de cor amarela.

Assim, juntaram-se 250 µl de plasma ou suspensão eritrocitária, 250 µl de H<sub>2</sub>O, 500 µl de TBA 42 mM e 250 µl de ácido fosfórico 0,44 M. Após 1 hora em banho fervente procedeu-se à precipitação das proteínas por adição a 500 µl da suspensão anterior, 500 µl de metanol/NaOH 1 M (10:1). Agitou-se no vórtex, centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 minutos e, em seguida, injectaram-se 20 µl do sobrenadante em sistema isocrático HPLC (Gilson), fluxo 1 ml/min, equipado com uma coluna analítica Spherisorb 5 µm ODS2 (4,6x250 mm), detector UV-Vis e injector automático de amostras. A fase móvel usada (mistura de 400 ml de metanol com 600 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH=6,8), foi previamente desgaseificada e filtrada sob vácuo através de uma membrana Schleicher&Schuell NC-20, Ø 47 mm e dimensão de poro = 0,2 µm.

A quantificação do MDA foi feita por extrapolação da área do pico numa curva de calibração traçada com padrões de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) de concentrações entre 0,5 e 10 µM, sujeitos a tratamento idêntico ao das amostras.

#### 3.3.2. Grupos carbonilo

O doseamento dos grupos carbonilo proteicos em amostras de plasma foi feito através de um método espectrofotométrico [312].

Foram adicionados 200 µl de plasma a dois tubos de polipropileno. Num dos tubos juntou-se 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM (ensaio) e, no outro tubo, foi adicionado 1 ml de ácido clorídrico (HCL) 2M (ensaio branco). As misturas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C. Após esta incubação procedeu-se ao arrefecimento das soluções.

Com as soluções já à temperatura ambiente foi adicionado 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 28%. Após esta adição homogeneizaram-se as soluções e centrifugaram-se 10 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de etanol/acetato de etilo (1:1) e agitou-se a mistura. Realizou-se uma nova centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm, rejeitando-se o sobrenadante no final da mesma. Repetiu-se o processo de lavagem e ressuspendeu-se o precipitado em 1,5 ml de guanidina-HCL 6M. Agitou-se o tubo e procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições da atrás descrita. Transferiu-se o sobrenadante do ensaio branco para uma cuvete e realizou-se a leitura espectrofotométrica num espectrofotómetro UVIKON 933-UV/Vis, termostatizado (Kontron Instruments) a 360 nm. Procedeu-se da mesma forma para o ensaio respectivo.

### 3.3.3. Metabolitos do monóxido de azoto

A concentração de nitratos e nitritos presentes nas amostras em estudo foram determinadas através de um procedimento que envolve duas fases (Reacção de Griess para determinação de nitratos e nitritos). Os nitratos são primeiro convertidos enzimaticamente a nitritos (usando a redutase do nitrato dependente de NADPH), seguindo-se então a medição dos nitritos totais por uma reacção estequiométrica com um reagente de Griess que dá origem a um azo-produto corado. A concentração original de nitritos pode ser determinada separadamente numa amostra que não tenha sido submetida à conversão dos nitratos, permitindo assim a quantificação dos nitratos por subtração.

Uma modificação deste método inclui a inclusão de um sistema regenerador de NADPH glicose-6-fosfato/glicose-6-fosfatase desidrogenase, para prevenir a possível interferência de elevadas concentrações de  $\text{NADP}^+$  no desenvolvimento de cor pela reacção de Griess.

Assim, para a determinação dos nitritos, pipetaram-se 100  $\mu\text{l}$  de amostra (plasma filtrado/plaquetas previamente sonicadas), padrões (nitrito de sódio 0,5; 1; 5; 10 e 25  $\mu\text{M}$ ) ou branco (água), em duplicado para uma microplaca de 96 poços.

Adicionaram-se 40  $\mu\text{l}$  de tampão de conversão (sem redutase do nitrato), 10  $\mu\text{l}$  de NADPH, 100  $\mu\text{l}$  de reagente de Griess e foi feita uma incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi feita a 450 nm (filtro de referência a

620 nm) e a concentração de nitritos foi determinada por extrapolação da curva de calibração.

Para a determinação dos nitritos + nitratos pipetaram-se 100 µl de amostra (plasma filtrado/plaquetas previamente sonicadas), padrões (nitrito de sódio 0,5; 1; 5; 10 e 25 µM) ou branco (água), em duplicado para uma microplaca de 96 poços.

Adicionaram-se 40 µl de tampão de conversão (com nitrato redutase) e 10 µl de NADPH. Agitou-se a placa e incubou-se 1 hora à temperatura ambiente para ocorrer a conversão de nitratos em nitritos.

Juntaram-se 100 µl de reagente de Griess e foi feita uma incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi feita a 450 nm (filtro de referência a 620 nm) e a concentração de nitritos + nitratos foi determinada por extrapolação da curva de calibração.

A concentração de nitratos foi determinada por subtração da concentração de nitritos medida na ausência de enzima à concentração de nitritos + nitratos totais determinada.

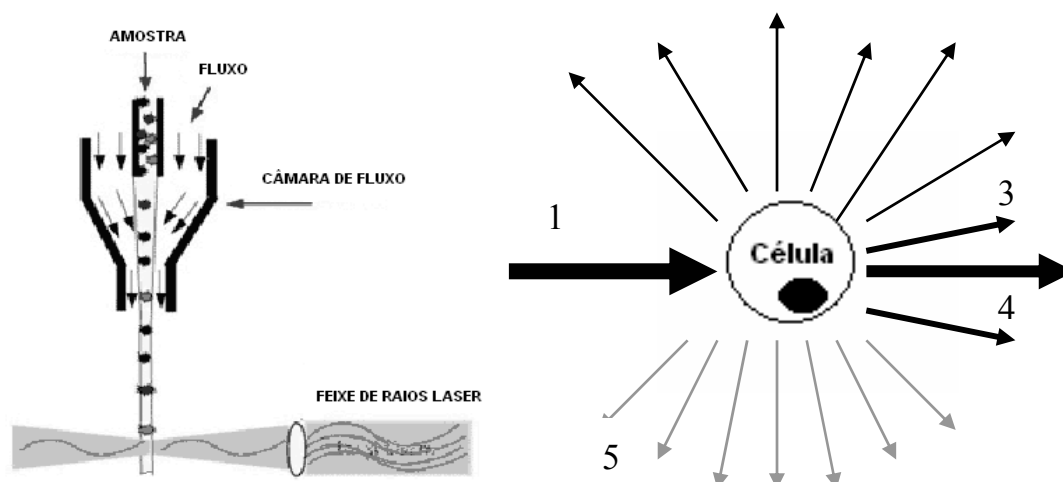
Os resultados foram representados em função da concentração de proteína presente nas amostras e do número de plaquetas.

#### 4. Citometria de fluxo

Os parâmetros para avaliação da inflamação e da morte celular, a seguir descritos, foram determinados por citometria de fluxo. Esta técnica foi desenvolvida na década de setenta nos Estados Unidos e na Alemanha como um importante avanço na investigação da Biologia Celular [313]. No entanto, foi só desde há aproximadamente 10 anos, que os avanços a nível da imunologia, oncologia e hematopatologia, com o aparecimento da tecnologia dos anticorpos monoclonais, permitiram a aplicação da citometria de fluxo à investigação biomédica [314].

Define-se um citómetro de fluxo como um instrumento capaz de medir componentes e propriedades das células e organelos celulares que fluem numa suspensão celular. Assim, é essencial dispor de uma suspensão celular. A possibilidade de conseguir uma suspensão celular individualizada depende do tipo de tecido a ser utilizado. As células ou partículas celulares são unidas a corantes específicos fluorescentes que têm a capacidade de se excitar ao entrarem em contacto com uma fonte luminosa de alta energia. A suspensão celular convenientemente processada e marcada é injectada na câmara de fluxo que está hidrodinamicamente focada para que as células passem individualmente uma atrás da outra através de um ponto onde interagem fisicamente com um raio de luz monocromática, dispersando a luz em todas as direcções. A luz dispersada para a frente (denominada *forward scatter* a 0 graus) está relacionada com o tamanho da célula. A luz dispersada para 90 graus de refacção (denominada *light scatter* a 90 graus) está relacionada com a estrutura interna e com a complexidade citoplasmática [313].





A.

B.

Figura 6. **A** – Os citómetros de fluxo usam o princípio da focagem hidrodinâmica para apresentarem células a um laser (ou qualquer outra fonte de luz). A amostra é injectada no centro do fluxo. O fluxo possui um diâmetro reduzido o que força a célula a deslocar-se para o centro do feixe. O laser vai então interagir com uma célula de cada vez. Este é um esquema simplificado da câmara de fluxo. **B** – Representação esquemática da interacção da luz com uma célula. Há emissão de fluorescência e a luz é desviada em todas as direcções. 1- Feixe de luz incidente. 2- A quantidade de luz desviada para ângulos grandes (15 a 150°) aumenta com a granulidade interna celular e com a rugosidade da superfície. 3- A quantidade de luz desviada para ângulos pequenos (0,5 a 5°) dá uma medida do tamanho da célula, mas pode ser afectada por outros factores como o índice de refacção. 4- Extinção, ou seja, a quantidade de luz que se perde a partir do feixe de luz incidente; representa a soma da luz absorvida e desviada pela célula. 5- A quantidade de fluorescência emitida deve ser menor que a quantidade de luz absorvida e, geralmente, é proporcional à quantidade de material intrínseco e/ou extrínseco na célula (adaptado de Shapiro, H. 1995 [313]).

A excitação dos fluorocromos ocorre no ponto de interacção da célula com o raio luminoso dando como resultado a emissão de uma luz de longitude de onda diferente da inicial. Esta luz é recolhida a 90 graus, sendo dirigidas as longitudes de onda seleccionadas mediante espelhos adequados até detectores fotomultiplicadores, enquanto as longitudes de onda não desejadas são bloqueadas por filtros ópticos. Se se tiver à disposição múltiplas fontes de luz, mais do que um fluorocromo pode ser usado para marcar as células, permitindo deste modo, medidas fluorescentes simultâneas de vários parâmetros numa só célula.

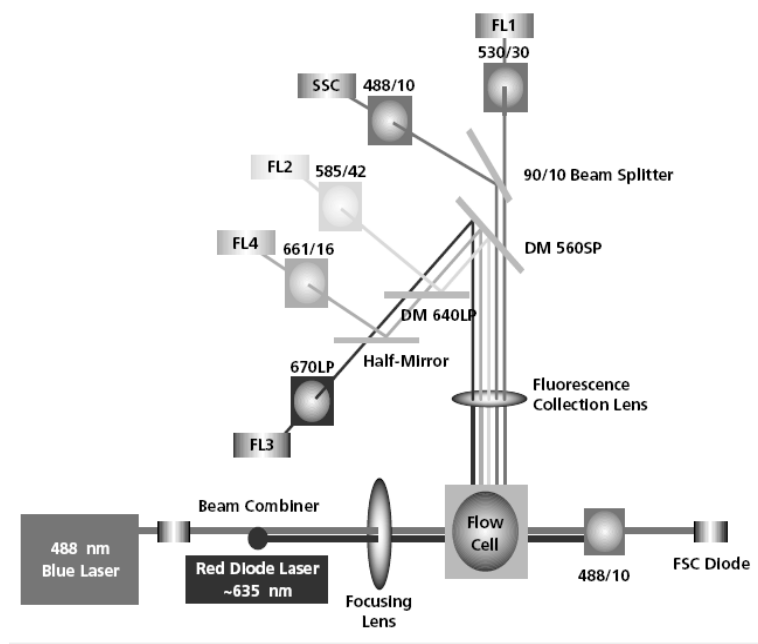


Figura 7. *Layout* óptico dos citómetros de fluxo FACScalibur [315].

Os sinais eléctricos analógicos são convertidos em sinais digitais e são processados por um computador com o objectivo de gerar histogramas que correlacionem os parâmetros desejados e efectuar análises dos mesmos.

Esta técnica permite medir características celulares individuais de um grande número de células (não uma média dos resultados) e para além disto permite medir características de populações em amostras heterogéneas [316].

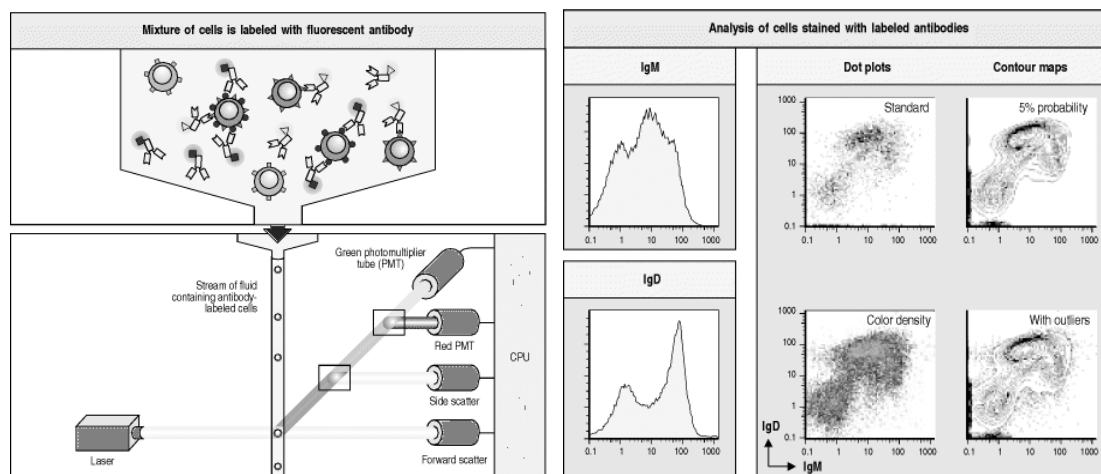


Figura 8. Esquema representativo do processo geral de análise citofluorimétrica. A figura da direita mostra exemplos de representações dos dados obtidos com este tipo de análise (adaptado de Janeway, C. *et al* [196]).

As vantagens proporcionadas pela citometria de fluxo quando comparada com outros métodos que trabalham com fluorocromos incluem a objectividade, elevada sensibilidade e velocidade de análise, possibilidade de realizar medições simultâneas sobre uma mesma célula e separação celular em *sorters*.

As desvantagens e limitações incidem nos elevados custos da instrumentação e na incapacidade de visualizar as células que estão a ser analisadas. Ou seja, a citometria de fluxo representa uma estratégia eficiente para o estudo da complexidade da arquitectura molecular celular, bem como da função celular através da análise de fenótipos moleculares em amostras celulares heterogêneas [317].

Como já foi referido, devido às características especiais dos citómetros de fluxo, a amostra a analisar deve encontrar-se sob a forma de suspensão monodispersa. Em função da amostra biológica que vai ser marcada e analisada por citometria devem ser utilizados protocolos diferentes.

Um factor limitante, comum em citometria de fluxo, é a disponibilidade de uma suspensão celular para estudar as suas características e relacionar os resultados obtidos com fenómenos *in vivo*. Para se conseguir estabelecer uma relação deste género, a suspensão celular deve ser representativa do tecido, deve ser de elevada qualidade, com poucos agregados, poucos detritos e baixo coeficiente de variação de sinais em populações homogêneas. As características dos componentes celulares que se querem estudar devem ser preservadas e deve haver uma quantidade suficiente de amostra para se poder realizar a

análise nas melhores condições.

O sangue e a medula óssea são tecidos que quase não necessitam de processamento quando comparados, por exemplo, com tumores sólidos que necessitam de uma desagregação intensa. Relativamente ao sangue periférico, o processamento necessário para uma análise citofluorimétrica recai apenas na destruição dos eritrócitos, nos casos em que estão presentes e não são objecto de estudo. Se o tecido a ser estudado for sólido há necessidade de utilizar métodos mecânicos ou enzimáticos. Todos estes procedimentos têm limitações, uma vez que produzem alterações das características celulares ou de antigénios membranares e a sua eficiência varia consideravelmente dependendo do tipo de tecido. Se se pretender analisar o imunofenótipo de superfície, devem ser utilizados métodos mecânicos, no entanto se se pretende estudar antigénios intracelulares é necessário permeabilizar a membrana celular, para ter acesso ao interior da célula. Existem protocolos que permitem simultaneamente a marcação de antigénios de superfície e antigénios intracelulares [318].

#### **4.1. Parâmetros inflamatórios**

Avanços tecnológicos recentes na disponibilidade e capacidade das análises citofluorimétricas, juntamente com avanços no conhecimento, nos últimos dez anos, fizeram com que a marcação intracelular da expressão de citocinas se tornasse uma técnica cada vez mais importante e disseminada. Este novo impulso iniciou-se com o trabalho de Andersson na Universidade de Estocolmo nos anos 80 que desenvolveu um sistema de fixação e permeabilização celular que mantinha os antigénios alvo intactos [319]. Desde então várias modificações têm optimizado esta técnica de forma a permitir a detecção e melhor caracterização de células secretoras de citocinas numa população heterogénea [320, 321].

A técnica básica é simples. Qualquer população de células secretoras de citocinas pode ser isolada e estimulada sob condições que previnem a secreção proteica durante um certo tempo. Após a fixação e permeabilização, as células são incubadas com um anticorpo específico para uma dada citocina, conjugado com um fluorocromo, o que permite a análise por citometria de fluxo.

Este tipo de análise tem várias vantagens:

- A análise de células individuais é possível tanto a nível de frequência como a nível de intensidade, sem necessidade do trabalho requerido para uma análise ELISpot.
- É possível detectar simultaneamente várias citocinas numa única célula.
- É possível uma análise rápida de grandes populações sem necessidade de clonagem ou cultura *in vitro* prolongada.

No entanto, assim como qualquer técnica, possui também algumas limitações e desvantagens inerentes:

- A síntese de citocinas não é constitutiva, mesmo durante processos inflamatórios graves. Assim, é requerida normalmente uma re-estimulação *in vitro*, o que aumenta a probabilidade da ocorrência de artefactos e traz problemas associados à activação, como a diminuição da expressão de alguns antígenos de superfície.
- Mesmo depois de estimuladas, nem todas as células produzem uma determinada citocina, nem a mesma célula produz citocinas diferentes com a mesma cinética.
- A informação fisiológica obtida através de técnicas como a hibridização *in situ* ou a imunohistoquímica é perdida.
- As células têm de ser mortas para se proceder à análise o que invalida a possibilidade de qualquer estudo funcional [322, 323].

#### 4.1.1. Determinação de citocinas intracelulares em monócitos

Este método utiliza marcações a duas cores, no estudo das células produtoras de IL-1 $\beta$  e das células produtoras de IL-12 e marcações a três cores no caso da detecção simultânea de IL-6 e TNF- $\alpha$ , baseando-se em protocolos previamente descritos [324-326].

##### **Activação celular**

Foram realizados dois ensaios, um correspondente a um controlo negativo (sem activação) e outro com activação celular.

Assim, num tubo de citómetro (tubo de polietileno de 5 mL) adicionaram-se 500  $\mu$ L de RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Scotland), 5  $\mu$ L de LPS (Lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli*, serotipo 055:B5, 100ng/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA), 2  $\mu$ L de brefeldina A (10 mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) e 500  $\mu$ L de sangue total heparinizado [327]. Não foram utilizados anticoagulantes quelantes de cálcio uma vez que estes impediriam o processo de activação celular.

Simultaneamente, num outro tubo de citómetro, adicionaram-se exactamente as mesmas soluções, à excepção do LPS (controlo negativo).

Foi feita uma incubação durante 6 horas, em atmosfera estéril, a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade.

##### **Marcação dos antígenos da superfície celular**

Após a incubação foram transferidos 200  $\mu$ L de cada um dos tubos anteriores (controlo e activado) para dois novos tubos de citómetro. Foram adicionados 3  $\mu$ L de anticorpo monoclonal anti-CD33-APC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Foi feita uma incubação durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente, após a qual se procedeu à lavagem das células (centrifugação a 1250 rpm durante 5 minutos, após a adição de 1 mL de *phosphate-buffered saline* (PBS, Biochrom AG)).

##### **Fixação e permeabilização celular**

Após centrifugação, a fase superior foi retirada com uma pipeta de Pasteur. Foram adicionados 100  $\mu$ L de solução A (Solução fixadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) ao precipitado e foi feita

nova incubação, nas mesmas condições daquela atrás referida, com subsequente lavagem com PBS. Foram adicionados 100 µl de solução B (Solução permeabilizadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### **Marcação das citocinas intracelulares**

Foram adicionados 10 µl dos seguintes anticorpos monoclonais ao tubo correspondente:

- Anti-IL-1β-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA);
- Anti-IL-6-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA);
- Anti-IL-12-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

No tubo correspondente à IL-6 foram também adicionados 8 µl de anticorpo monoclonal anti-TNF-α-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Foi feita nova incubação, nas condições atrás referidas. As células foram lavadas duas vezes com PBS, tal como anteriormente descrito. O precipitado resultante foi ressuspensionado com 500 µl de PBS.

### **Leitura citofluorimétrica**

A leitura citofluorimétrica foi realizada num citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o *software* CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Por cada amostra foram recolhidos 10 000 eventos totais e 10 000 monócitos, após *live gate* em CD33.

#### *4.1.2. Determinação de citocinas intracelulares em linfócitos*

Este método utiliza marcações a quatro cores (detecção simultânea da IL-6 e do TNF-α) e baseia-se em protocolos previamente descritos [324, 326]. Não foram utilizados ensaios controlo (sem estimulação) devido ao facto de ter sido descrito anteriormente que estas células não apresentam positividade para citocinas se não forem estimuladas [328].

### **Activação celular**

Num tubo de citómetro adicionaram-se 500 µl de RPMI-1640 (Gibco, Paisley,

Scotland), 25 µl de PMA (*phorbol 12-myristato 13-acetato*, 25 ng/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 µl de ionomicina (Sal de cálcio de *Streptomyces conglobatus*, 0,1 mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 µl de brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 500 µl de sangue total heparinizado.

Foi feita uma incubação durante 4 horas, em atmosfera estéril, a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade.

### **Marcação dos antígenos da superfície celular**

Após a incubação transferiram-se 200 µl para um novo tubo de citómetro. Foram adicionados 10 µl dos seguintes anticorpos monoclonais:

- Anti-CD8-PerCP (BD Biosciences, San Jose, CA, USA);
- Anti-CD3-APC (PharMingen, San Diego, CA, USA).

Foi feita uma incubação durante 10 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após esta incubação as células foram lavadas com PBS (centrifugação a 1250 rpm durante 5 minutos, após a adição de 1 mL de PBS).

### **Fixação e permeabilização celular**

O sobrenadante resultante foi retirado com uma pipeta de Pasteur e ao precipitado foram adicionados 100 µl de solução A (Solução fixadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). Foi feita uma incubação durante 15 minutos, seguida de lavagem nas condições atrás referidas. Após decantação do sobrenadante foram adicionados 100 µl de solução B (Solução permeabilizadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### **Marcação das citocinas intracelulares**

Adicionaram-se os seguintes anticorpos monoclonais ao precipitado resultante:

- 8 µl de TNF- $\alpha$ -FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA);
- 10 µl de IL-6 – PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Foi feita uma nova incubação de 15 minutos nas condições das anteriores, após a qual foram feitas duas lavagens das células. Após decantação do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de PBS.



### **Leitura citofluorimétrica**

A leitura citofluorimétrica foi realizada num citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o *software* CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Por cada amostra foram recolhidos 10 000 eventos totais e 10 000 linfócitos, após *live gate* em linfócitos (SSC vs FSC).

## **4.2. Expressão de Bax e Bcl2 em leucócitos**

### **Fixação e permeabilização celular**

Adicionaram-se, a 100 µl sangue total colhido em EDTA (Etileno-diamina-tetra-acetato), 100 µl de solução A (Solução fixadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), incubou-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente, adicionando ao fim desse tempo, 1 mL de PBS. Centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos a 1250 rpm. Decantaram-se e adicionaram-se 100 µl de solução B (Solução permeabilizadora do kit Fix & Perm Cell Permeabilization, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### **Marcação dos antígenos específicos**

Adicionaram-se 2 µl de anticorpo monoclonal anti-Bax (Immunotech, Marseille, France). Fez-se uma incubação nas condições da anterior, durante 15 minutos. No final deste tempo adicionou-se 1 ml de PBS e centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos a 1500 rpm. Decantou-se o sobrenadante e adicionaram-se 20 µl de anticorpo secundário Goat-anti-mouse-PE (DakoCytomation, Denmark) diluído 1:10 ao precipitado resultante. Incubaram-se as amostras durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. No final deste tempo foi adicionado 1ml de *phosphate buffered saline* (PBS) (Biochrom, Berlin, Germany) e foi feita uma centrifugação durante 5 minutos a 1500g. Decantou-se o sobrenadante e ao precipitado resultante adicionaram-se 10 µl dos seguintes anticorpos monoclonais:

- Anti-CD19-PerCP cy5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA);
- Anti-CD3-APC (Pharmingen, San Diego, CA, USA);

- Anti-Bcl-2-FITC (DakoCytomation, Denmark).

Foi feita uma nova incubação nas condições das anteriores, durante 10 minutos com posterior lavagem das células. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 500 µl PBS.

#### **Leitura citofluorimétrica**

A leitura citofluorimétrica foi realizada num citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o *software* CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Por cada amostra foram recolhidos 10 000 eventos totais e 10 000 linfócitos, após *live gate* em linfócitos (SSC vs FSC).

### **4.3. Expressão de Fas e FasL em leucócitos**

#### **Marcação dos antígenos específicos**

A 100 µl de sangue total colhido em EDTA, adicionaram-se 2 µl de anticorpo monoclonal anti-FasL (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Incubaram-se as amostras 10 minutos no escuro à temperatura ambiente e, após este tempo, procedeu-se à lavagem das células (centrifugação a 1250 rpm durante 5 minutos, após a adição de 1 ml de PBS).

Após a centrifugação o sobrenadante foi decantado, tendo sido adicionados 20 µl de anticorpo secundário Goat-anti-mouse-PE (DakoCytomation, Denmark) diluído 1:10. Foi feita uma incubação de 30 minutos no escuro a 4° C, tendo sido adicionado, ao fim deste tempo, 1 ml de PBS. Posteriormente foi feita uma nova centrifugação durante 5 minutos a 1250 rpm.

Após decantação, adicionaram-se 10 µl dos seguintes anticorpos monoclonais ao precipitado resultante:

- Anti-CD19-PerCP cy5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA);
- Anti-CD3-APC (Pharmingen, San Diego, CA, USA);
- Anti-CD95-FITC (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Incubaram-se as amostras 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após os 10

minutos adicionaram-se 2 ml de solução lisante (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubaram-se as amostras novamente, durante 10 minutos, no escuro e à temperatura ambiente.

No final deste tempo as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1250 rpm, após o que, se procedeu à lavagem das células. O precipitado resultante após decantação foi ressuspendido em 500 µl de PBS.

### **Leitura citofluorimétrica**

A leitura citofluorimétrica foi realizada num citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o *software* CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Por cada amostra foram recolhidos 10 000 eventos totais e 10 000 linfócitos, após *live gate* em linfócitos (SSC vs FSC).

## 5. Estudo genético

### 5.1. Discriminação alélica por PCR em Tempo Real

Avanços recentes na área da biologia molecular levaram ao desenvolvimento de técnicas, que não envolvem a utilização de géis, para uma genotipagem rápida precisa e pouco dispendiosa, que permitem o rastreio de grandes populações. Uma destas técnicas, o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em Tempo Real TaqMan<sup>®</sup>, permite que a amplificação e detecção sejam feitas numa única etapa [329].

Nos ensaios de PCR 5'nuclease, uma sonda de hibridização, incluída na reacção PCR, é clivada pela actividade 5'nuclease da *Taq* DNA polimerase apenas nos casos em que há amplificação do DNA alvo hibridizado com esta mesma sonda [330]. A utilização de uma sonda fluorogénica permite que a clivagem da sonda seja detectada sem processamento pós-PCR [331].

A sonda fluorogénica consiste num oligonucleótido marcado com um grupo repórter fluorescente e um *quencher* não fluorescente. Na sonda intacta a proximidade do *quencher* provoca transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), o que reduz a fluorescência do marcador repórter. A quebra da sonda fluorogénica durante a PCR liberta o marcador repórter, provocando um aumento na intensidade de fluorescência deste, uma vez que o efeito de Förster deixa de se verificar (Figura 9).

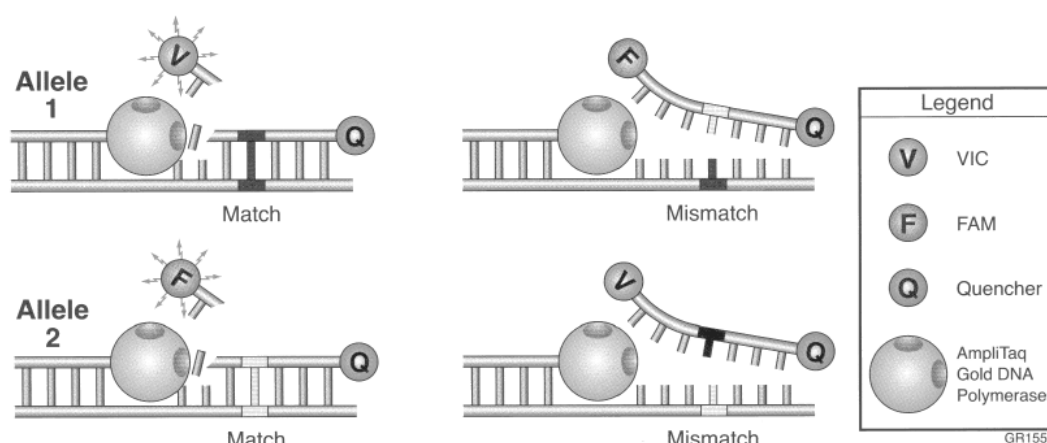


Figura 9. Esquema do desenho do ensaio para discriminação alélica utilizando sondas fluorogénicas. Quando a sonda não é totalmente complementar do DNA em estudo (quando há um *mismatch*), a ligação da sonda a este DNA é destabilizada, reduzindo a eficiência da clivagem da sonda pela enzima.

Para um sistema bi-alélico são incluídas na PCR sondas específicas para cada alelo. Estas sondas podem ser distinguidas uma da outra porque são marcadas com grupos repórter diferentes (FAM<sup>TM</sup> e VIC, na figura 9). Quando o processo de extensão leva a *Taq* DNA polimerase até ao local onde está completamente hibridizada uma sonda, a actividade exonucleásica desta enzima cliva eficientemente a sonda e consequentemente liberta o grupo repórter. A existência de um *mismatch* entre a sonda e o DNA alvo reduz a eficiência da hibridização e consequente clivagem.

Assim, um aumento substancial nas fluorescências dos marcadores VIC ou FAM indica homozigotia para os alelos especificamente marcados com cada um destes marcadores. Um aumento nas fluorescências dos dois marcadores indica heterozigotia.

Livack *et al*, em 1995 concluíram que sondas com um grupo repórter na extremidade 5' e um grupo *quencher* na extremidade 3' podem ser usadas em ensaios 5' nuclease, o que tornou extremamente mais simples o desenho destas sondas [332]. Esta descoberta baseou-se no facto destes dois grupos, apesar de relativamente distantes um do outro enquanto numa cadeia linear, se aproximarem o suficiente para se verificar o efeito FRET, uma vez que cadeias oligonucleotídicas simples são suficientemente flexíveis para se contorcem quando em solução.

Três factores principais contribuem para a discriminação alélica baseada na ocorrência de um único *mismatch*:

- O *mismatch* tem um efeito perturbador da hibridização. Uma sonda não completamente hibridizada terá uma temperatura de *melting*  $T_m$  mais baixa quando comparada com uma sonda que hibridiza perfeitamente. Uma boa escolha da temperatura de *annealing*/extensão na PCR irá favorecer a hibridização de uma sonda completamente complementar do DNA alvo em detrimento de uma sonda não completamente complementar.
- O ensaio é realizado sob condições competitivas com ambos os tipos de sondas presentes no mesmo tubo, logo as sondas com *mismatches* são impedidas de hibridizar devido à ligação estável que se forma entre as sondas completamente complementares ao DNA alvo.
- A extremidade 5' da sonda deve começar a ser separada antes da clivagem ocorrer. A actividade 5' nuclease da *Taq* DNA polimerase reconhece uma estrutura em forma de garfo com uma cadeia 5' separada de pelo menos 1 a 3

nucleótidos [333]. Quando uma sonda começa a ser separada, a dissociação completa ocorre de forma mais rápida se existir um *mismatch*. Isto significa que há menos tempo para a clivagem nas sondas que não são completamente complementares ao DNA alvo. Assim, a presença de um *mismatch* promove a dissociação e não a clivagem da sonda.

A discriminação alélica é conseguida usando uma temperatura de *annealing*/extensão dentro da janela de temperatura de *melting* criada pela diferença de  $T_m$  dos dois tipos de sonda. À medida que a sonda se torna mais longa um único *mismatch* torna-se menos perturbador da hibridização. Isto significa que, para sondas maiores, a diferença de  $T_m$  entre os dois tipos de sondas é menor, o que leva a uma janela de  $T_m$  menor, também. Ou seja, sondas mais pequenas têm melhores resultados nos ensaios de discriminação alélica baseados em *mismatches*.

A ligação de MGB (*Minor Groove Binder*) aos oligonucleótidos estabiliza as cadeias duplas de ácidos nucleicos e consequentemente aumenta dramaticamente a  $T_m$  desses mesmos oligonucleótidos [334].

As sondas fluorogénicas com MGB ligado na extremidade 5' têm um bom desempenho nos ensaios 5' nucleases. Em comparação com sondas sem MGB ligado são melhores porque sequências pequenas podem ser usadas para obter sondas com uma  $T_m$  óptima entre os 65 e 67°C. Isto permite a utilização de sondas mais curtas e consequentemente uma discriminação melhorada de *mismatches*.

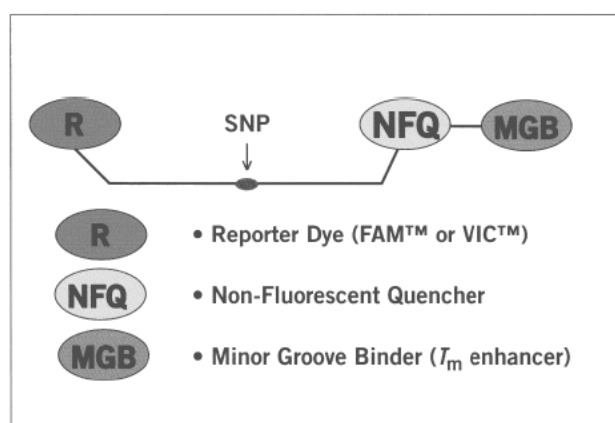


Figura 10. Diagrama de uma sonda fluorogénica TaqMan® MGB.

Os ensaios 5' nuclease com sondas fluorogénicas têm várias vantagens:

- São homogêneos, ocorrendo em tubo fechado.
- Não necessitam de processamento pós-PCR.
- São tão sensíveis quanto uma reacção PCR normal, o que permite a utilização das mesmas quantidades mínimas de DNA genómico.
- A utilização de sondas ligadas a MGB aumenta a probabilidade de sucesso do ensaio.
- Utilizam condições de reacção universais.
- São rápidos, precisos e de fácil aplicação a qualquer discriminação alélica.

#### 5.1.1. Polimorfismos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$

Os ensaios de discriminação alélica por PCR em Tempo Real foram desenhados usando o serviço Assay-by-Design<sup>SM</sup> oferecido pela Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Cada *assay* contém uma mistura de *forward primer*, *reverse primer*, sonda marcada com 6FAM<sup>TM</sup> dye-MGB e sonda marcada com VIC<sup>®</sup> dye-MGB. Cada uma das sondas liga-se preferencialmente a um dos alelos.

As combinações de *primers* e sondas usadas estão listadas na Tabela IV. Todas estas combinações foram desenhadas para funcionar utilizando condições universais de reacção e de amplificação.

A genotipagem foi realizada em reacções de 5  $\mu$ l, consistindo em 10 ng de DNA genómico, 0,125  $\mu$ l de *assay mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e 2,5  $\mu$ l de Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG (2x) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A amplificação foi realizada utilizando o aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Foram utilizadas as mesmas condições de amplificação para todos os polimorfismos: 50°C, 2 minutos; 95°C, 10 minutos; 40 ciclos de 95°C, 15 segundos e 60°C, 1 minuto.

O *software Sequence Detection System* (SDS), versão 2.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para determinar automaticamente os genótipos em causa, através de gráficos de dois parâmetros utilizando as intensidades de fluorescência de FAM e de VIC.

Tabela IV- Combinações *primers*/sondas utilizadas para determinação dos genótipos das várias citocinas em estudo.

Citocina SNP	Cromossoma	Substituição	Oligo	Sequência 5'→ 3' (fluoróforo)
TNF- $\alpha$ (-857) rs1799724 <sup>a</sup>	6	G→A	Primer-F	GGGCTATGGAAGCTCGAGTATGG
			Primer-R	GTCCTGGAGGCTCTTCACT
			Sonda-G	VIC-CCCTGTCTTCGTTAAGG
			Sonda-A	FAM-CCTGTCTTATTAAGG
TNF- $\alpha$ (-308) rs1800629 <sup>a</sup>	6	T→C	Primer-F	CCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTT
			Primer-R	GGACCCTGGAGCGCTGAAC
			Sonda-T	VIC-CCCGTCCTCATGCC
			Sonda-C	FAM-CCCGTCCCCATGCC
TNF- $\alpha$ (-238) rs361525 <sup>a</sup>	6	A→G	Primer-F	CAGTCAGTGGCCCAGAAGAC
			Primer-R	CCCTCACACTCCCCATCCT
			Sonda-A	VIC-CTCGGAATCAGAGCAG
			Sonda-G	FAM-CTCGGAATCCGGAGCAG
IL-6 (-174) rs1800795 <sup>a</sup>	7	G→C	Primer-F	GACGACCTAAGTCTGCACTTTTC
			Primer-R	GGGCTGATTGGAACCTTATTAAGATTG
			Sonda-G	VIC-CTTTAGCATGGCAAGAC
			Sonda-C	FAM-CTTTAGCATCAGCAAGAC
IL-6 (-572) rs1800796 <sup>a</sup>	7	C→G	Primer-F	AGGATGGCCAGCGCAGTTC
			Primer-R	CCAGTCATCTGAGTTCTTCTGTGTT
			Sonda-C	VIC-TACAACCAGCCCCTCACAG
			Sonda-G	FAM-AACAGCCGCTCACAG
IL-1 $\beta$ (+3954) rs1143634 <sup>a</sup>	2	G→A	Primer-F	ACCTAAACAACATTGTGCTCCACA
			Primer-R	ATCGTGACATAAGCCTCGTTA
			Sonda-G	VIC-CATGTGTGCGAAAGAAGA
			Sonda-A	FAM-CATGTGTCAAAGAAGA

<sup>a</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbSNP ID number.

## 5.2. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

Uma vez que existem inúmeras sequências reconhecidas por endonucleases de restrição tipo II, muitos polimorfismos pontuais podem ser caracterizados por alelos que possuem ou não o local de reconhecimento para uma determinada endonuclease e assim



criam polimorfismos de locais de restrição. Normalmente estes polimorfismos têm dois alelos detectáveis (um que possui, e outro que não possui o local de restrição). Podem ser detectados por digestão de amostras de DNA genómico com a enzima de restrição relevante, com posterior identificação dos fragmentos específicos de restrição cujos tamanhos são característicos dos dois alelos, os chamados *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP's). Estes foram a primeira geração de marcadores de DNA. Inicialmente eram determinados preparando *Southern blots* dos produtos de digestão do DNA em estudo e hibridizados com sondas radioactivas. Hoje em dia, os RFLP's podem ser determinados utilizando apenas a PCR. Assim, uma sequência que inclui o local de restrição variável é amplificada, o produto da amplificação é incubado com a enzima de restrição apropriada e posteriormente, o resultado desta digestão é corrido num gel para ver se ocorreu, ou não, corte no local de restrição [335].

Esta técnica torna possível determinar quais os alelos presentes em cada amostra, de uma forma relativamente rápida.

#### 5.2.1. Polimorfismo -511 do gene da IL-1 $\beta$

O polimorfismo rs3087258 do promotor do gene da Interleucina 1 $\beta$  é resultado de uma transição de uma Citosina para uma Timina na posição -511.

Foram utilizados 10 ng de DNA genómico na presença de 1.1x Thermo-Start<sup>®</sup> PCR Master Mix (1,25U Thermo-Start<sup>®</sup> DNA polimerase; tampão de reacção Thermo-Start<sup>®</sup> 1x; 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; ABgene, Rochester, NY, USA), e 20  $\mu$ M de cada *primer*.

A reacção PCR foi realizada recorrendo aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 95°C 15 minutos; 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos; 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Foram utilizados 10  $\mu$ l do produto desta reacção para verificação da correcta amplificação, utilizando para o efeito uma electroforese em gel de agarose a 2%. Após esta verificação, o restante produto PCR foi digerido durante a noite a 37°C com 1U da enzima *AvaI*.

O genótipo foi determinado através da separação do produto da digestão por

electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta.

A presença do nucleótido Citosina resulta em dois fragmentos com 190 e 114 pares de base, enquanto a presença de uma Timina resulta na visualização de apenas um fragmento (produto PCR não digerido) com 304 pares de base.

#### 5.2.2. Polimorfismo 1188 do gene da IL-12

O polimorfismo rs3212227 do gene IL 12B, localizado no cromossoma 5q31.1-33.1, resultado de uma transição de uma Adenina para uma Citosina, foi determinado amplificando a região que contém a região 3'UTR, do mesmo gene.

Foram utilizados 10 ng de DNA genómico na presença de 1.1x Thermo-Start® PCR Master Mix (1,25U Thermo-Start® DNA polimerase; tampão de reacção Thermo-Start® 1x; 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; ABgene, Rochester, NY, USA), e 20 µM de cada *primer*.

A reacção PCR foi realizada recorrendo aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 95°C 15 minutos; 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 48°C 30 segundos, 72°C 45 segundos; 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Foram utilizados 10 µl do produto desta reacção para verificação da correcta amplificação, utilizando para o efeito uma electroforese em gel de agarose a 2%.

O fragmento amplificado contém a posição 1188 do gene IL 12B, a qual codifica o nucleótido A (alelo A) ou o nucleótido C (alelo B). Este último resulta na criação de um local de restrição da enzima *TaqI*. Assim, após a electroforese de verificação de amplificação, os produtos PCR foram digeridos durante a noite com 1U da enzima de restrição *TaqI* a 65°C. O genótipo foi determinado através da separação do produto da digestão por electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta.

Consequentemente, a presença do nucleótido Citosina resulta em dois fragmentos com 165 e 68 pares de base, enquanto a presença de uma Adenina resulta na visualização de apenas um fragmento (produto PCR não digerido) com 233 pares de base.

**Tabela V- Características dos ensaios utilizados para a determinação dos genótipos por PCR-RFLP das citocinas em estudo.**

Citocina SNP	Cromosoma	Substituição	Primers 5' → 3'	Enzima <sup>b</sup>	Padrão de restrição (pb)	Ref.
IL-1β (-511) rs3087258 <sup>a</sup>	2	C → T	F-TGGCATTGATCTGGTTCATC R-GTTTAGAATCTTCCCACTT	AvaI	C - 190 + 114 T - 304	[336]
IL-12 (1188) rs3212227 <sup>a</sup>	5	A → C	F-TTCTATCTGATTTGCTTTA R-TGAAACATTCCATACATCC	TaqI	A - 233 C - 68 + 165	[337]

<sup>a</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbSNP ID number; <sup>b</sup> Endonuclease de restrição utilizada para digerir os produtos PCR respectivos.

### 5.2.3. Genótipo APOE (Apolipoproteína E)

As três principais isoformas da apolipoproteína E humana (apoE2, -E3, e -E4), identificadas por focagem isoelétrica, são codificadas por três alelos (epsilon 2, 3, e 4). As isoformas E2, E3 e E4 diferem em dois locais das suas sequências aminoácídicas: resíduo 112 (local A) e 158 (local B). Nos locais A/B, a apo E2, -E3, e -E4 contêm cisteína/cisteína, cisteína/arginina e arginina/arginina, respectivamente [338].

O genótipo do gene da APOE localizado no cromossoma 19q3.2 foi determinado utilizando 10 ng de DNA genómico na presença de 1.1x Thermo-Start<sup>®</sup> PCR Master Mix (1,25U Thermo-Start<sup>®</sup> DNA polimerase; tampão de reacção Thermo-Start<sup>®</sup> 1x; 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; ABgene, Rochester, NY, USA), 20 µM de cada primer e 1,5 µl de DMSO (Dimetil sulfoxido).

A reacção PCR foi realizada recorrendo aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 95°C 15 minutos; 40 ciclos de 95°C 30 segundos, 70°C 30 segundos, 72°C 30 segundos; 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Foram utilizados 10 µl do produto desta reacção para verificação da correcta amplificação, utilizando para o efeito uma electroforese em gel de agarose a 2%.

Após a electroforese de verificação de amplificação, 10 µl dos produtos PCR foram digeridos durante a noite com 0,75U da enzima de restrição *Hin6I* a 37°C. O genótipo foi determinado através da separação do produto da digestão por electroforese em gel de agarose a 4%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta [339, 340].

**Tabela VI – Sequências oligonucleotídicas 5'→3' utilizadas como *primers* para a determinação do genótipo APOE.**

<b>Primers utilizados (5'→ 3'):</b>	
<b>F:</b>	GACGGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGACGCAGGCCCGGCTGGACGCGGACATGGAGGA
<b>R:</b>	AGGCCACGCTCGACGCCCTCGCGGGCCCCGGCCTGGTACACT

















<b>E2/E2</b>	<b>E2/E3</b>	<b>E2/E4</b>	<b>E3/E3</b>	<b>E3/E4</b>	<b>E4/E4</b>	<b>Pb</b>
						144
						96
						72
						48

Figura 11. Esquema dos resultados possíveis após digestão da sequência de DNA amplificada, com a enzima Hin61; Pb – Tamanhos (pares de base) dos fragmentos obtidos.

## 6. Análise estatística

Para a caracterização da amostra foram usadas medidas de tendência central e dispersão e os resultados expressos como médias  $\pm$  desvios-padrão dos valores determinados para cada parâmetro analisado.

As comparações das médias registadas nos diferentes grupos foram efectuadas através do teste *t de Student* ou de uma análise de variância (anova), dependendo do número de grupos em comparação. Neste último caso, depois de serem determinadas as diferenças existentes entre as médias, foram utilizados testes *post hoc* para determinar quais as médias que diferiam. Utilizaram-se os testes Bonferroni e Games-Howell para amostras apresentando ou não homogeneidade de variâncias, respectivamente.

Na avaliação de relações entre variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Para testar a existência de associação entre variáveis foi utilizado o teste  $\chi^2$ . A avaliação da sobrevivência cumulativa sem doença foi realizada pela análise de Kaplan-Myer e estatística *log rank*.

Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Estas análises foram realizadas com recurso aos *softwares* Microsoft® Excel 2002 e *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 10.0.1. A análise de haplótipos foi realizada recorrendo ao *software* Arlequin, versão 2.000 [341].

## RESULTADOS

### 1. Caracterização da população

#### 1.1. Grupos em estudo para a determinação dos parâmetros inflamatórios, de stresse oxidativo e de morte celular

A primeira avaliação permitiu comparar vários parâmetros relativos aos indivíduos dos três grupos em estudo, como pode ser observado na Tabela VII. O grupo DCL era constituído por 45 indivíduos, dos quais 26 do sexo feminino (46%) e 19 do sexo masculino (54%); o grupo controlo era constituído por 25 indivíduos, dos quais 19 eram do sexo feminino (76%) e 6 do sexo masculino (24%) e o grupo DA era constituído por 35 indivíduos, dos quais 16 eram do sexo feminino (46%) e 19 do sexo masculino (54%).

A média de idades entre os três grupos não é significativamente diferente, sendo  $p=0,49$  entre o grupo controlo e o grupo DCL;  $p=0,86$  entre o grupo DCL e o grupo DA e  $p=0,39$  entre os grupos controlo e DA.

A média de idades de início entre os grupos DCL e DA também não apresenta diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,74$ ).

Não foi possível, por parte da equipa médica, determinar os anos de escolaridade dos indivíduos controlo participantes neste estudo. No entanto, entre os grupos DCL e DA a média de anos de escolaridade não difere significativamente ( $p=0,21$ ).

**Tabela VII- Caracterização de cada um dos grupos estudados, atendendo aos seguintes parâmetros: idades, idades de início, score MMSE, ADAS-cognitivo e anos de escolaridade.**

	Idade	Idade de início	MMSE	ADAS-Cog	Escolaridade
<b>Ctrl (n=25)</b>	69,1 ± 8,3 (56-83)	-	-	-	-
<b>DCL (n=45)</b>	70,7 ± 8,6 (52-85)	68,0 ± 8,0 (50-81)	27,6 ± 2,2 (22-30)	9,2 ± 4,2 (2-20)	6,5 ± 4,2 (0-15)
<b>DA (n=35)</b>	71,0 ± 7,7 (50-89)	67,4 ± 9,0 (48-88)	21,7 ± 4,1 (12-28)	21,0 ± 8,9 (8-46)	5,3 ± 3,9 (0-15)

Os resultados são apresentados como médias ± desvios-padrão e os valores máximo e mínimo registados para cada parâmetro avaliado.

## 1.2. Grupos em estudo na análise dos polimorfismos genéticos

No que diz respeito ao estudo de associação entre doentes e indivíduos controlo, foram feitas subdivisões do grupo de doentes.

Determinaram-se grupos de doentes com forma esporádica da doença de Alzheimer e de doentes com forma esporádica e com idade de início superior a 65 anos de idade. Este último grupo, embora tenha um número de indivíduos inferior ao desejável, representa um grupo de doentes de Alzheimer com as características mais comumente encontradas. Devido à elevada prevalência da doença de Alzheimer, considerou-se que os doentes apresentavam uma história familiar positiva desta doença apenas nos casos de existência de familiares em primeiro grau afectados. A Tabela VIII apresenta as médias das idades, idades de início e número de indivíduos do sexo masculino e feminino para cada um dos grupos em estudo.

**Tabela VIII- Características dos vários grupos estudados geneticamente.**

Grupo	n	Média de Idades (anos)	Média de Idades de Início (anos)	Sexo	
				F	M
<b>DA</b>	196	69,5 ± 9,6	65,9 ± 9,6	125 (63,8%)	71 (36,2%)
<b>DA ≥ 65 e história fam. neg.</b>	109	75,0 ± 5,2	71,6 ± 5,1	65 (59,6%)	44 (40,4%)
<b>DA&gt;65</b>	130	74,9 ± 5,0	71,5 ± 4,9	78 (60%)	52 (40%)
<b>DA &lt; 65</b>	66	58,7 ± 6,9	54,9 ± 6,6	47 (71,2%)	19 (28,8%)
<b>DCL</b>	53	69,5 ± 9,7	67,3 ± 9,5	31 (58,5%)	22 (41,5%)
<b>Ctrl</b>	98	74,0 ± 6,9	-	67 (68,4%)	31 (31,6%)

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA≥65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

## 2. Parâmetros inflamatórios

### 2.1. Primeira avaliação

#### 2.1.1. Determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ em monócitos

Os monócitos foram identificados nas amostras sanguíneas estudadas com base na sua expressão de CD33 e nas suas características únicas de FSC/SSC, como pode ser observado na Figura 12.

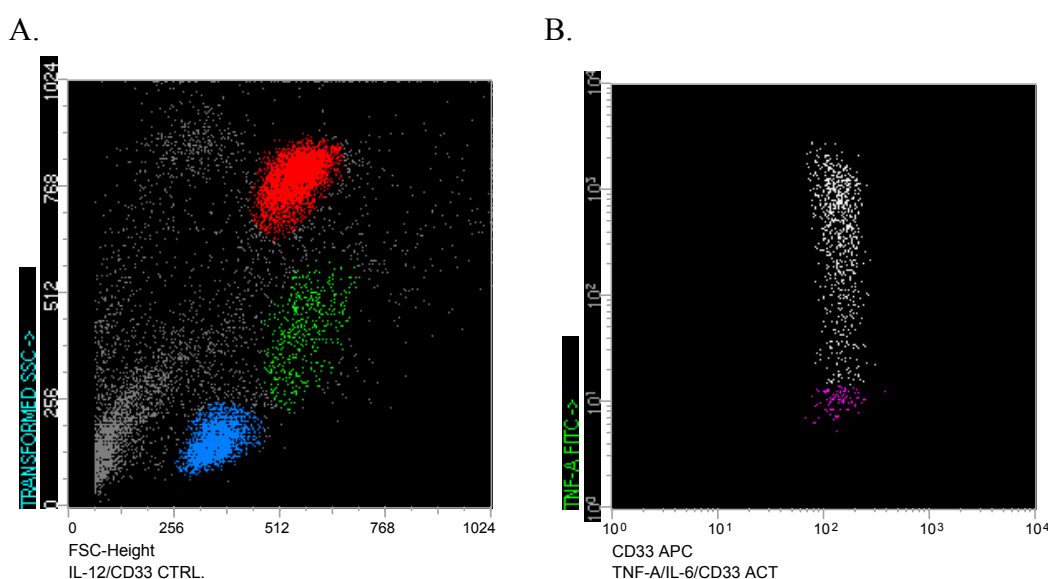


Figura 12. A – Identificação dos monócitos do sangue periférico com base nas suas características de FSC e SSC. B – *Dot plot* de dois parâmetros representativo da secreção de TNF- $\alpha$  por monócitos após estimulação com LPS (100 ng/ml) na presença de brefeldina A (10  $\mu$ g/ml).

Assim, foi determinada a média de monócitos produtores de cada uma das citocinas estudadas (em percentagem) e a média de intensidade de fluorescência associada. Isto tanto nos casos em que ocorreu estimulação das células com LPS (ensaio com ativação) e nos casos em que não ocorreu qualquer estimulação *in vitro* (ensaio sem ativação).

A percentagem de monócitos foi determinada após remoção dos fragmentos de glóbulos vermelhos. Posteriormente, a análise da expressão de cada citocina foi feita após *live gate* em CD33.



Na Tabela IX são apresentadas as médias e respectivos desvios padrão relativos a cada uma das citocinas estudadas em cada grupo.

**Tabela IX- Percentagem de monócitos produtores de citocinas e quantidades de citocinas produzidas nos três grupos estudados.**

			Ctrl	DCL	DA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Não ativado	%	14,7 $\pm$ 25,6	33,1 $\pm$ 35,4 <sup>■</sup>	62,4 $\pm$ 42,4 <sup>*</sup>
		MIF	47,7 $\pm$ 36,3	68,4 $\pm$ 69,5 <sup>■</sup>	62,1 $\pm$ 38,2 <sup>♦♦</sup>
	Activado	%	65,5 $\pm$ 22,7	76,5 $\pm$ 23,2 <sup>■</sup>	85,9 $\pm$ 18,4 <sup>♦♦</sup>
		MIF	427,6 $\pm$ 234,6	345,6 $\pm$ 260,3 <sup>■</sup>	327,8 $\pm$ 194,9 <sup>♦♦</sup>
<b>IL-6</b>	Não ativado	%	12,9 $\pm$ 25,9	24,8 $\pm$ 35,0 <sup>■</sup>	54,7 $\pm$ 44,7 <sup>*</sup>
		MIF	25,6 $\pm$ 8,0	27,1 $\pm$ 11,7 <sup>■</sup>	31,3 $\pm$ 11,3 <sup>♦♦</sup>
	Activado	%	50,5 $\pm$ 26,9	59,2 $\pm$ 28,2 <sup>■</sup>	73,8 $\pm$ 29,7 <sup>♦♦</sup>
		MIF	49,3 $\pm$ 13,4	58,8 $\pm$ 31,0 <sup>■</sup>	60,0 $\pm$ 28,6 <sup>♦♦</sup>
<b>IL-12</b>	Não ativado	%	3,5 $\pm$ 8,7	13,0 $\pm$ 27,7 <sup>**</sup>	42,0 $\pm$ 39,9 <sup>♦</sup>
		MIF	23,8 $\pm$ 8,6	27,7 $\pm$ 11,4	33,4 $\pm$ 10,9
	Activado	%	18,2 $\pm$ 17,9	30,5 $\pm$ 27,8 <sup>*</sup>	43,8 $\pm$ 36,7 <sup>♦</sup>
		MIF	28,9 $\pm$ 9,5	28,0 $\pm$ 8,5 <sup>*■</sup>	34,7 $\pm$ 11,5 <sup>♦♦</sup>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Não ativado	%	12,2 $\pm$ 22,6	20,6 $\pm$ 31,7 <sup>■</sup>	36,8 $\pm$ 37,5 <sup>♦♦</sup>
		MIF	32,4 $\pm$ 14,6	33,4 $\pm$ 27,6 <sup>■</sup>	33,6 $\pm$ 9,5 <sup>♦♦</sup>
	Activado	%	70,6 $\pm$ 27,3	79,8 $\pm$ 22,1 <sup>■</sup>	78,8 $\pm$ 22,3 <sup>♦♦</sup>
		MIF	81,1 $\pm$ 77,2	52,4 $\pm$ 27,4	42,9 $\pm$ 12,8

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. % - Percentagem; MIF – Média de Intensidade de Fluorescência; Ctrl – Grupo controlo; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Doença de Alzheimer; \* p<0,05 e \*\* p<0,005 quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦ p<0,05 e ♦♦ p<0,005 quando os grupos DA e controlo são comparados; ■ p<0,05 e ■■ p<0,005 quando os grupos DCL e controlo são comparados.

A determinação da capacidade de resposta dos monócitos a um estímulo inflamatório foi determinada pela subtração das médias das percentagens e das MIFs obtidas nos ensaios sem activação àquelas obtidas nos ensaios com activação (Tabela X).

**Tabela X- Diferenças entre as médias (percentagens e MIFs) obtidas para os ensaios com activação e para os ensaios sem activação.**

Grupo	TNF- $\alpha$		IL-6		IL-12		IL-1 $\beta$	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
Ctrl	50,82	379,85	37,59	23,71	14,77	5,09	58,32	48,75
DCL	43,39	277,18	34,40	31,62	17,49	0,34	59,14	19,08
DA	23,46	265,66	19,01	28,75	1,79	1,24	41,99	9,33

% - Percentagem; MIF – Média de Intensidade de Fluorescência; Ctrl – Grupo controlo; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Doença de Alzheimer

Os indivíduos do grupo controlo apresentam uma percentagem superior de monócitos periféricos, quando comparados com os indivíduos com doença de Alzheimer. Por observação da Figura 13 pode facilmente perceber-se que o grupo DCL apresenta uma quantidade intermédia de monócitos circulantes, entre o grupo controlo e o grupo DA.

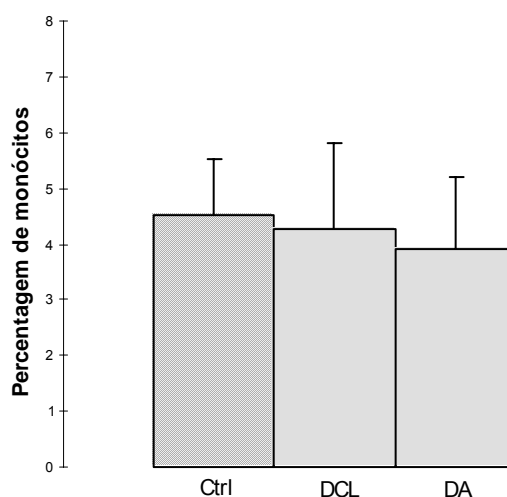
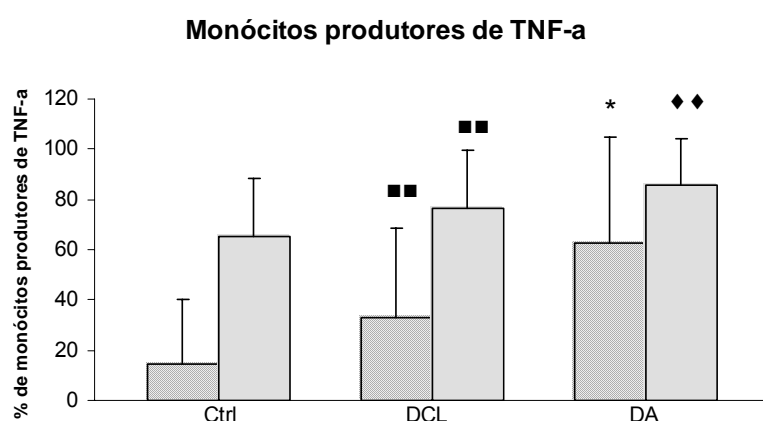


Figura 13. Média da percentagem de monócitos periféricos em cada um dos grupos estudados.

Tendo em conta os valores da Tabela IX, a percentagem de monócitos produtores de TNF- $\alpha$  é significativamente diferente entre os três grupos, tanto a nível dos ensaios com estimulação das células com LPS, como nos ensaios sem activação. A média de intensidade relativa a esta citocina é significativamente diferente nos grupos DA e DCL, relativamente ao grupo controlo.

A.



B.

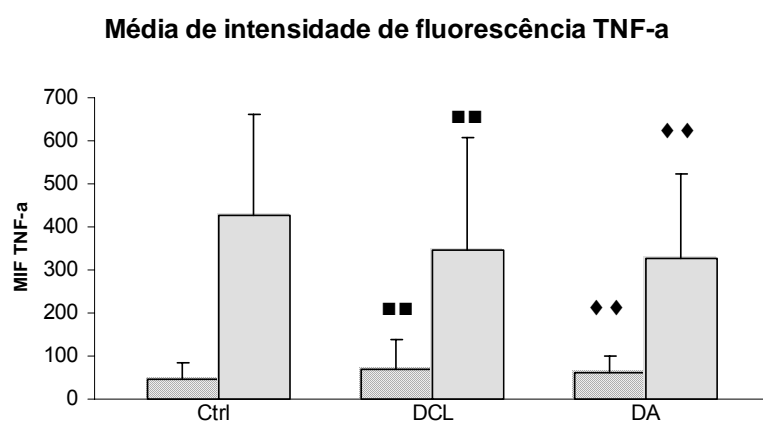
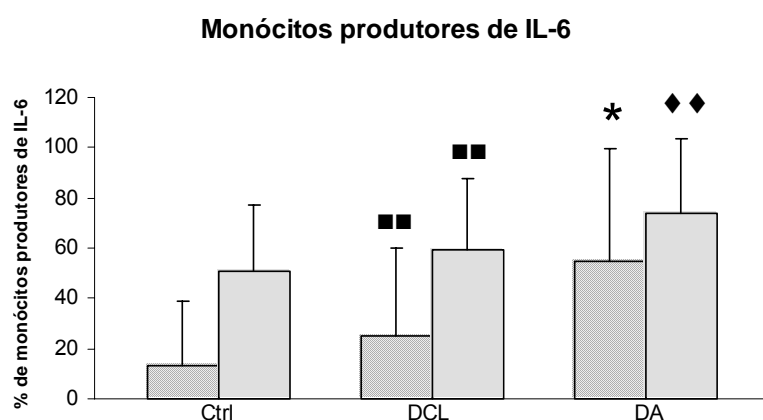


Figura 14. A- Média da percentagem de monócitos produtores de TNF- $\alpha$  nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B- Média de Intensidades de Fluorescências nos três grupos relativamente à citocina TNF- $\alpha$ . Em ambos os gráficos, as barras da esquerda referem-se aos ensaios em monócitos não estimulados *in vitro* e as barras da direita aos ensaios em monócitos sujeitos a activação com LPS durante 6 horas. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦  $p < 0,05$  e ♦♦  $p < 0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados; ■  $p < 0,05$  e ■■  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e controlo são comparados.

Relativamente à interleucina 6 e tendo em conta os valores da Tabela IX, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DCL e DA e entre os grupos controlo e DCL, a nível da percentagem de monócitos não activados e entre os grupos DA e controlo e DCL e controlo, a nível dos ensaios realizados após estimulação celular com LPS. Encontraram-se ainda diferenças estatisticamente significativas nas médias de intensidade de fluorescência entre os grupos controlo e DA, nos ensaios com monócitos não activados e nos ensaios com monócitos activados (Figura 15).

A.



B.

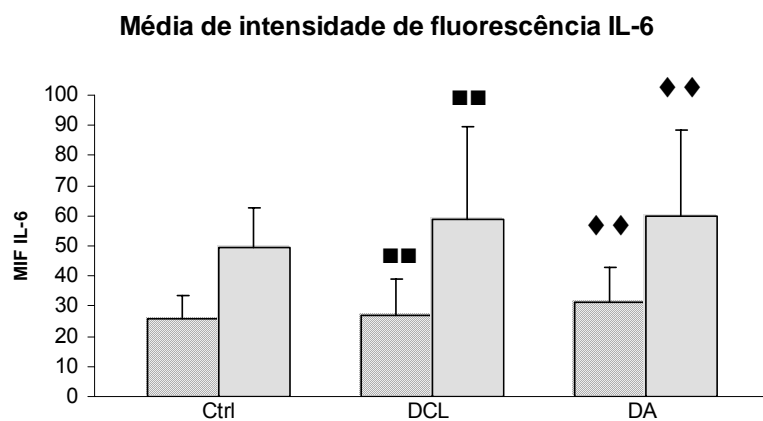
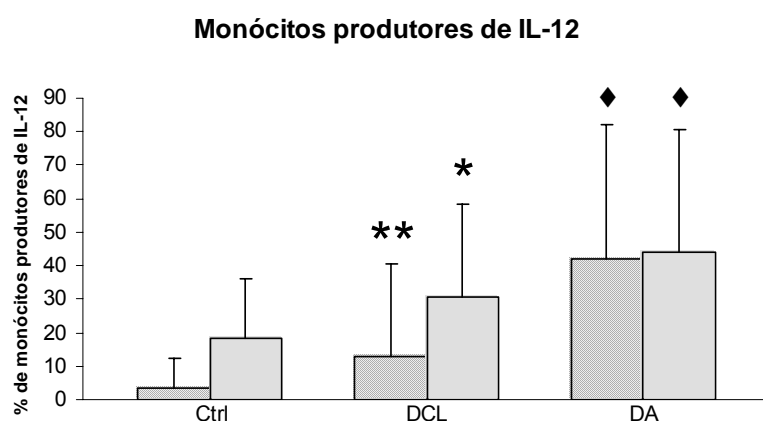


Figura 15. A- Média da percentagem de monócitos produtores de IL-6 nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B- Média de Intensidades de Fluorescências nos três grupos relativamente à citocina IL-6. Em ambos os gráficos, as barras da esquerda referem-se aos ensaios em monócitos não estimulados *in vitro* e as barras da direita aos ensaios em monócitos sujeitos a activação com LPS durante 6 horas. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦  $p < 0,05$  e ♦♦  $p < 0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados; ■  $p < 0,05$  e ■■  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e controlo são comparados.

Os resultados relativos à interleucina 12 mostram diferenças significativas a nível da média da percentagem de monócitos produtores desta mesma citocina, não activados, entre os grupos controlo e DA e entre os grupos DCL e DA (Figura 16). Relativamente às células activadas, encontraram-se diferenças significativas entre os grupos controlo e DA. As médias de intensidades de fluorescência são também significativamente diferentes, a nível dos ensaios com células activadas, entre todos os grupos estudados.

A.



B.

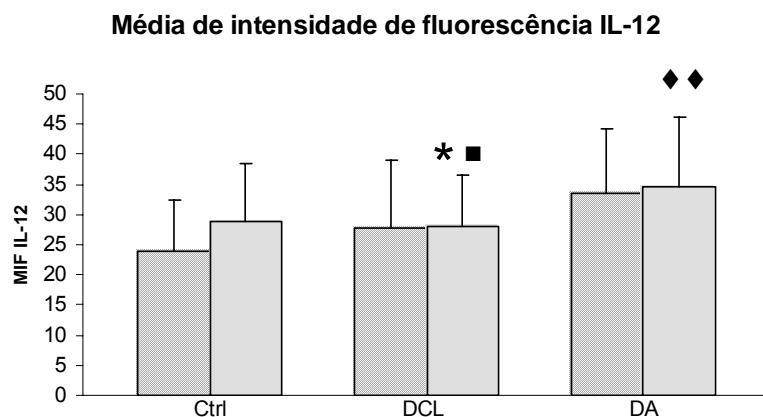
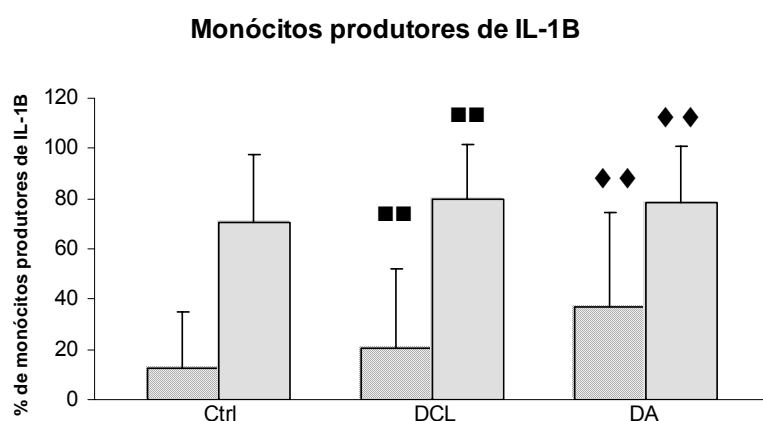


Figura 16. A- Média da percentagem de monócitos produtores de IL-12 nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B- Média de Intensidades de Fluorescências nos três grupos relativamente à citocina IL-12. Em ambos os gráficos, as barras da esquerda referem-se aos ensaios em monócitos não estimulados *in vitro* e as barras da direita aos ensaios em monócitos sujeitos a activação com LPS durante 6 horas. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦  $p < 0,05$  e ♦♦  $p < 0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados; ■  $p < 0,05$  e ■■  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e controlo são comparados.

Os resultados relativos à interleucina 1 $\beta$  mostram diferenças significativas entre a média da percentagem de monócitos produtores desta interleucina, tanto a nível dos ensaios com estimulação celular como nos ensaios sem activação, entre os grupos controlo e DA e entre os grupos controlo e DCL. As médias de intensidade de fluorescência são também significativamente diferentes entre os mesmos grupos, a nível dos ensaios sem estimulação (Figura 17).

A.



B.

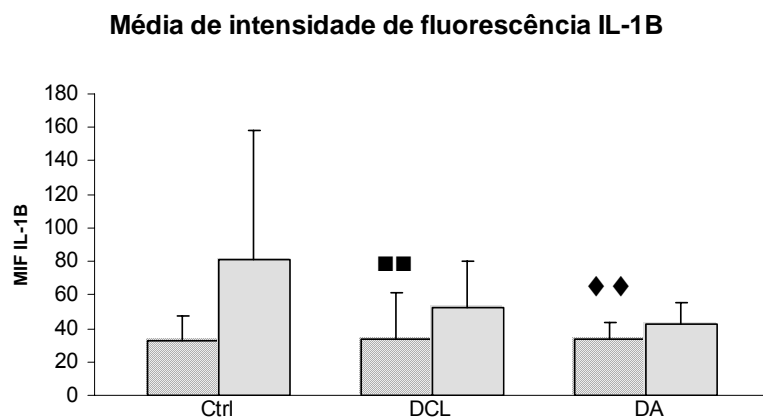


Figura 17. A- Média da percentagem de monócitos produtores de IL-1 $\beta$  nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B- Média de Intensidades de Fluorescências nos três grupos relativamente à citocina IL-1 $\beta$ . Em ambos os gráficos, as barras da esquerda referem-se aos ensaios em monócitos não estimulados *in vitro* e as barras da direita aos ensaios em monócitos sujeitos a activação com LPS durante 6 horas. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦  $p < 0,05$  e ♦♦  $p < 0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados; ■  $p < 0,05$  e ■■  $p < 0,005$  quando os grupos DCL e controlo são comparados.

A análise da correlação (coeficiente de Pearson) entre os parâmetros inflamatórios determinados em monócitos e a idade dos indivíduos de cada grupo em estudo revelou a existência de algumas correlações significativas.

De uma forma geral, a idade parece ter uma maior influência nestes parâmetros a nível do grupo DA, quando comparado com os outros dois grupos em estudo. O método de regressão permite ter uma ideia acerca da relação entre duas variáveis, sendo esta mais facilmente visualizada graficamente. Os gráficos a seguir apresentados estabelecem a relação entre a idade dos indivíduos e os vários parâmetros estudados a nível dos monócitos. É apresentada a recta de regressão linear, bem como o valor de  $R^2$ .

A Figura 18 representa as correlações entre as idades dos indivíduos de cada grupo e os parâmetros determinados relativamente ao TNF- $\alpha$ . A percentagem de monócitos não activados, no grupo DCL, correlaciona-se negativamente e de forma significativa ( $P<0,01$ ) com a idade dos indivíduos. É também encontrada uma correlação significativa ( $P<0,05$ ), mas neste caso positiva, entre as idades dos doentes de Alzheimer estudados e a média de intensidade de fluorescência relativa a esta citocina, nos ensaios sem activação.

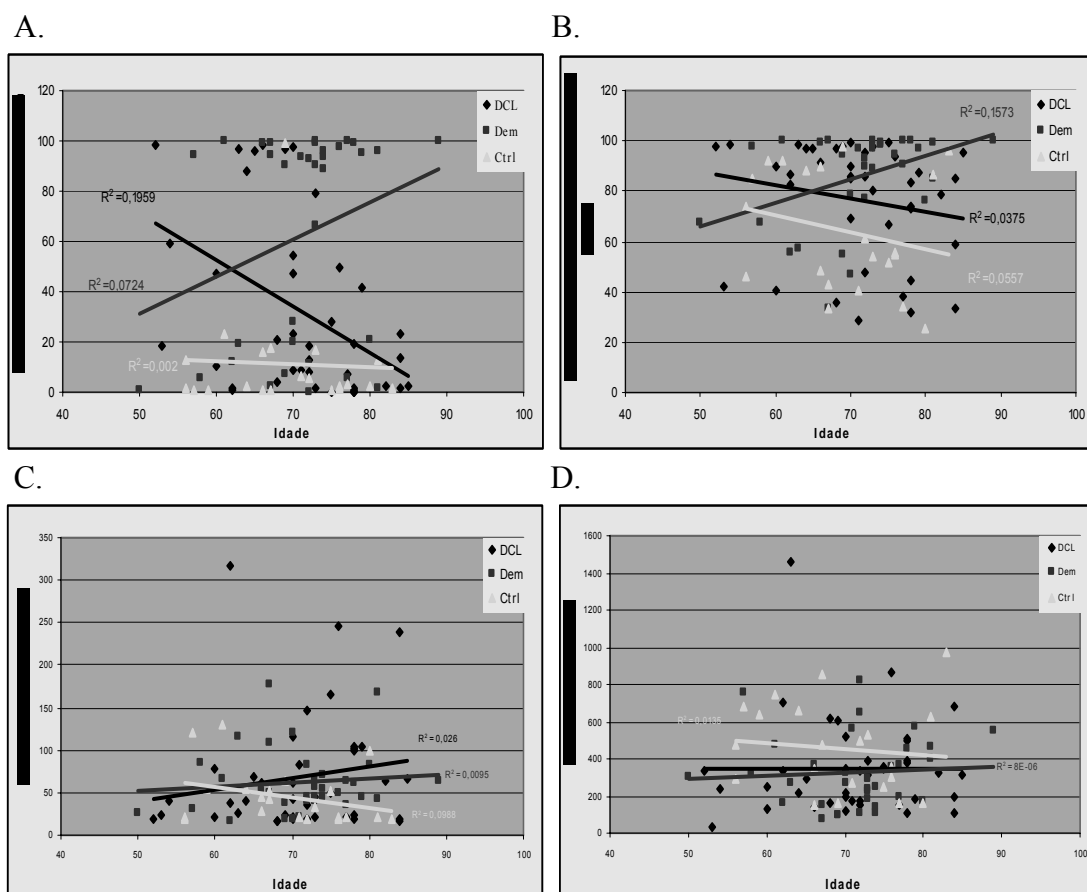


Figura 18. Correlação entre as idades dos indivíduos de cada grupo em estudo (DCL, DA e Ctrl) e a percentagem de monócitos produtores de TNF- $\alpha$  (A, B) e a média de intensidades de fluorescências (C, D), nos ensaios sem activação (A, C) e após estimulação com 100 ng/ml, durante 6 horas (B, D).

A Figura 19 representa as correlações entre as idades dos indivíduos de cada grupo e os parâmetros determinados relativamente à interleucina 6. A percentagem de monócitos não activados, no grupo DA, correlaciona-se positivamente e de forma significativa ( $P<0,05$ ) com a idade dos indivíduos. No mesmo grupo encontra-se também uma correlação positiva e significativa ( $P<0,01$ ), entre as idades e a média de intensidade de fluorescência relativa a esta citocina, nos ensaios sem activação.



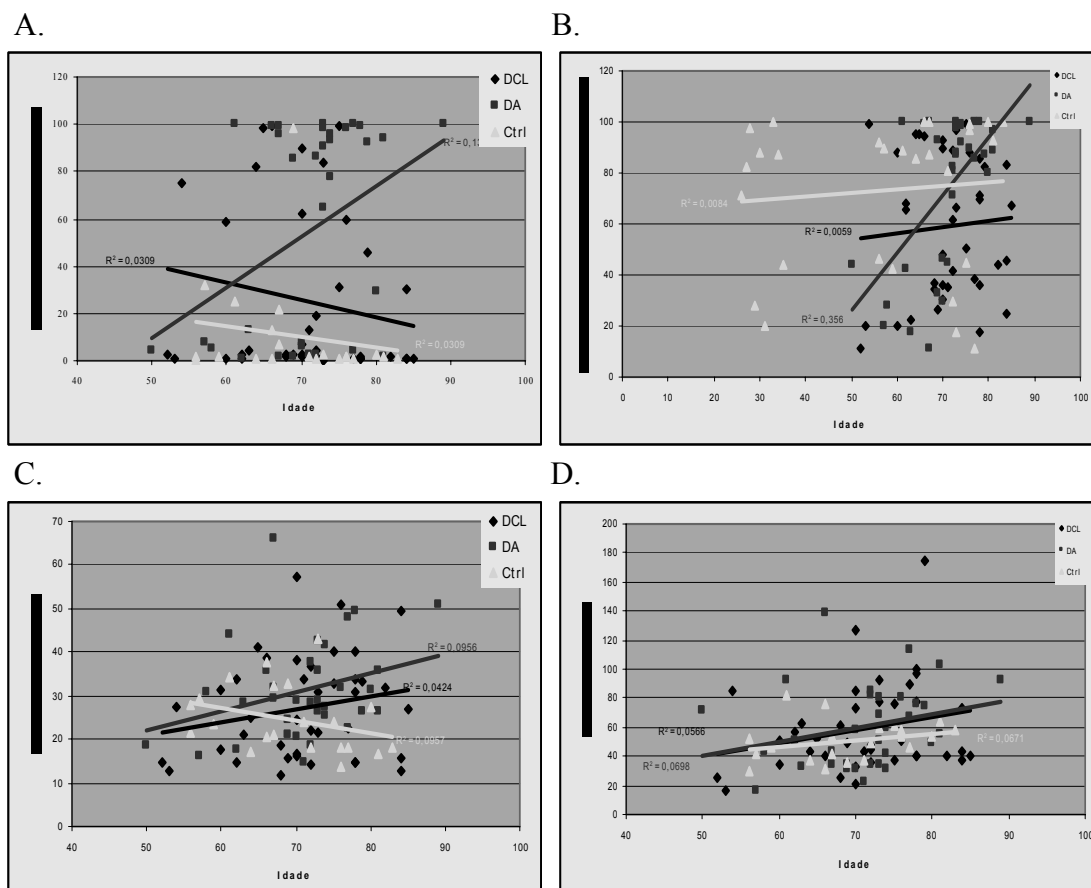


Figura 19. Correlação entre as idades dos indivíduos de cada grupo em estudo (DCL, DA e Ctrl) e a percentagem de monócitos produtores de IL-6 (A, B) e a média de intensidades de fluorescências (C, D), nos ensaios sem activação (A, C) e após estimulação com 100 ng/ml de LPS, durante 6 horas (B, D).

A Figura 20 representa as correlações entre as idades dos indivíduos de cada grupo e os parâmetros determinados relativamente à interleucina 12. A percentagem de monócitos activados, no grupo DA, correlaciona-se positivamente e de forma significativa ( $P < 0,05$ ) com a idade dos indivíduos. No mesmo grupo, encontram-se também correlações positivas e significativas entre as idades e a média de intensidade de fluorescência relativa a esta citocina, nos ensaios sem e com activação ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente).

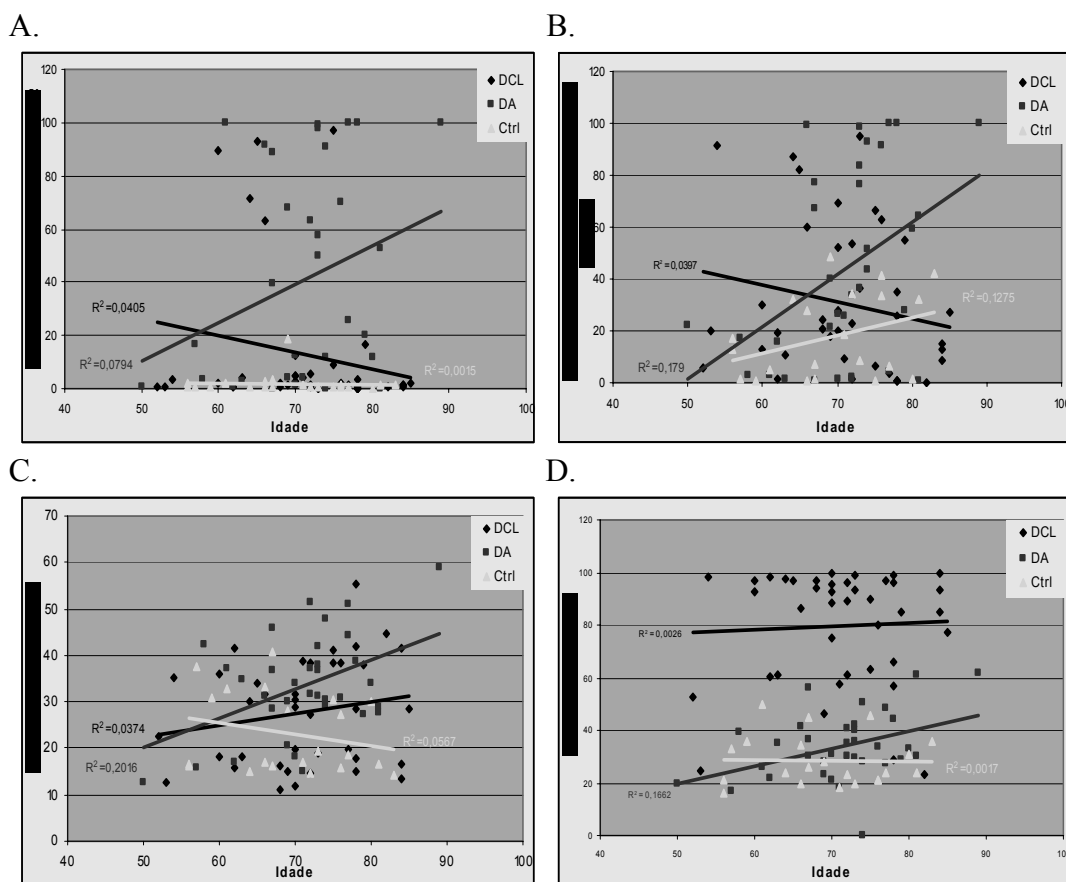


Figura 20. Correlação entre as idades dos indivíduos de cada grupo em estudo (DCL, DA e Ctrl) e a percentagem de monócitos produtores de IL-12 (A, B) e a média de intensidades de fluorescências (C, D), nos ensaios sem activação (A, C) e após estimulação com 100 ng/ml de LPS, durante 6 horas (B, D).

A análise da correlação entre os parâmetros inflamatórios determinados em monócitos e as idades de início dos indivíduos pertencentes aos grupos DA e DCL revelou a existência de algumas correlações significativas (Tabela XI). De uma forma geral, os parâmetros inflamatórios analisados a nível dos monócitos parecem ter uma maior correlação com as idades de início dos indivíduos com doença de Alzheimer do que nos indivíduos com DCL.

**Tabela XI- Correlações entre idades de início da doença dos indivíduos dos grupos DCL e DA e os parâmetros inflamatórios determinados em monócitos.**

		<i>TNF-α</i>				<i>IL-6</i>				<i>IL-12</i>				<i>IL-1β</i>			
		NA		Activado		NA		Activado		NA		Activado		NA		Activado	
		% Mon		% Mon		% Mon		% Mon		% Mon		% Mon		% Mon		% Mon	
		%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
<b>DCL</b>	0,19	<b>-0,41**</b>	-0,14	0,09	0,19	-0,21	0,06	0,20	0,18	-0,19	-0,24	0,15	0,04	-0,24	-0,01	0,03	0,02
<b>DA</b>	-0,11	0,31	0,33	0,29	-0,18	<b>0,40*</b>	0,52	<b>0,45*</b>	0,18	<b>0,41*</b>	<b>0,50**</b>	0,35	<b>0,55**</b>	0,17	0,09	<b>0,36*</b>	-0,23

% Mon – Percentagem de monócitos; NA – Não activado; DP – Desvio padrão; % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Grupo de indivíduos com doença de Alzheimer; \* P<0,05; \*\* P<0,01.

A análise da correlação entre os parâmetros inflamatórios determinados em monócitos e os valores obtidos na escala MMSE dos indivíduos pertencentes aos grupos DA e DCL revelou a existência de apenas uma correlação significativa (P<0,05) entre os níveis médios de monócitos e os valores de avaliação cognitiva desta escala, no grupo DA (Figura 21).

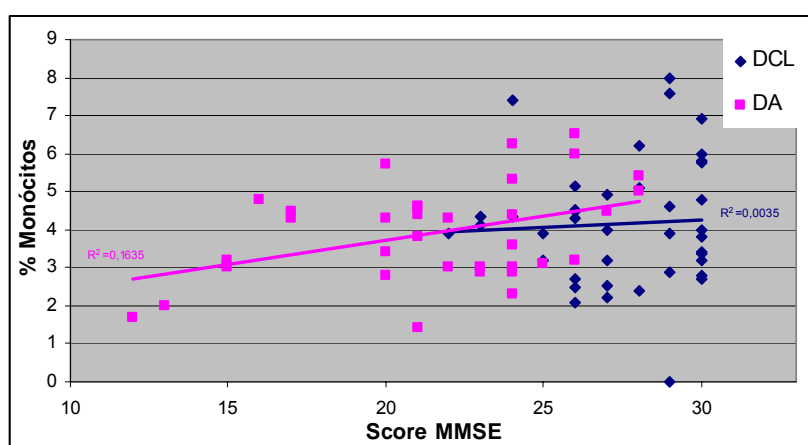


Figura 21. Correlação entre os valores obtidos na escala MMSE e a percentagem média de monócitos, nos grupos DCL e DA.

### 2.1.2. Determinação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 em linfócitos

Os linfócitos foram identificados nas amostras sanguíneas em estudo, com base nas suas características únicas de FSC e SSC. Assim, foi determinada a média de linfócitos produtores de TNF- $\alpha$  (em percentagem) e a média de intensidade de fluorescência associada.

A percentagem de cada tipo linfocitário (CD3+/CD8+; CD3+/CD8-; CD3-/CD8- e CD3-/CD8+) foi determinada na população total de células após remoção dos fragmentos de células vermelhas. Posteriormente, a análise da expressão de TNF- $\alpha$  foi feita após *live gate* em linfócitos.

Os primeiros resultados obtidos para a interleucina 6 mostraram valores muito discrepantes. Assim sendo, foram apenas analisados os resultados relativos ao Factor de Necrose Tumoral. A Tabela XII mostra os resultados da análise das populações linfocitárias, a nível dos três grupos em estudo.

**Tabela XII- Análise das populações linfocitárias relativamente à produção de TNF- $\alpha$ , nos três grupos em estudo.**

		Ctrl	DCL	DA
% Linfócitos		34,2 $\pm$ 7,4	33,0 $\pm$ 8,7	34,2 $\pm$ 8,9
<b>Linfócitos</b>	CD3+/CD8+	4,7 $\pm$ 1,8	5,4 $\pm$ 2,3	5,6 $\pm$ 2,3
	CD3+/CD8-	19,0 $\pm$ 4,8	17,5 $\pm$ 6,4	19,1 $\pm$ 6,8
	CD3-/CD8-	9,2 $\pm$ 3,3	8,4 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 3,4
	CD3-/CD8+	1,0 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 1,2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CD3+/CD8+	%	42,1 $\pm$ 30,4	50,2 $\pm$ 31,4
		MFI	109,1 $\pm$ 41,8	103,1 $\pm$ 67,7
	CD3+/CD8-	%	44,8 $\pm$ 26,9	49,4 $\pm$ 29,2
		MFI	100,5 $\pm$ 39,9	101,8 $\pm$ 56,8
	CD3-/CD8+	%	20,3 $\pm$ 30,0	31,0 $\pm$ 34,7
		MFI	50,3 $\pm$ 45,6	37,4 $\pm$ 26,6

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; Ctrl – Grupo Controlo; DCL – Grupo com Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Grupo de indivíduos com doença de Alzheimer.

Não foram encontradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros estudados a nível dos linfócitos entre os grupos controlo, DCL e DA.

A Figura 22 mostra que existem diferenças muito pequenas nas percentagens médias de linfócitos entre os três grupos. No entanto, ao contrário do que se registou a nível monocitário, o grupo DCL não apresenta valores intermédios entre os outros dois grupos. Este grupo apresenta a média mais baixa entre os três.

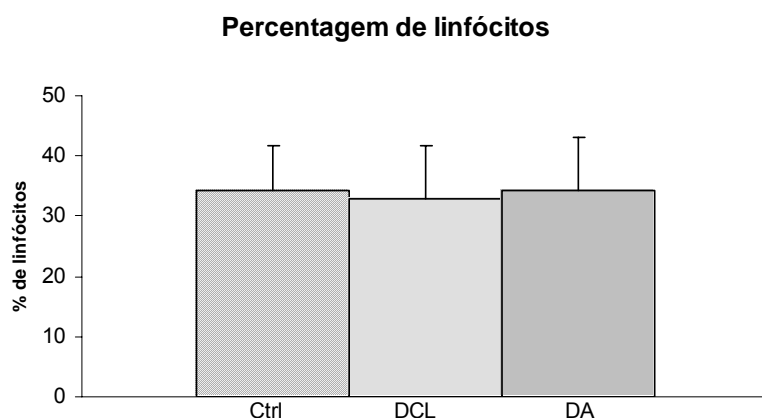


Figura 22. Comparação das médias das percentagens de linfócitos nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). Não se registou qualquer diferença significativa entre grupos.

A análise dos vários subtipos linfocitários estudados demonstra a inexistência de um padrão entre as médias das percentagens destas células nos três grupos. Os linfócitos CD3+CD8- existem em maior quantidade, quando comparados com os outros tipos de linfócitos, enquanto os linfócitos CD3-CD8+ são os que apresentam uma menor percentagem, entre os quatro tipos linfocitários (Figura 23).

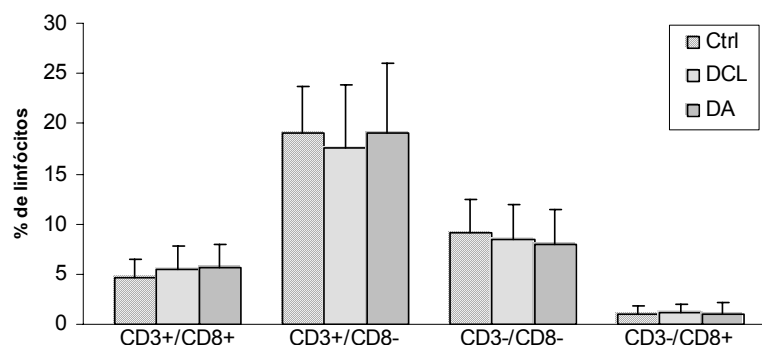
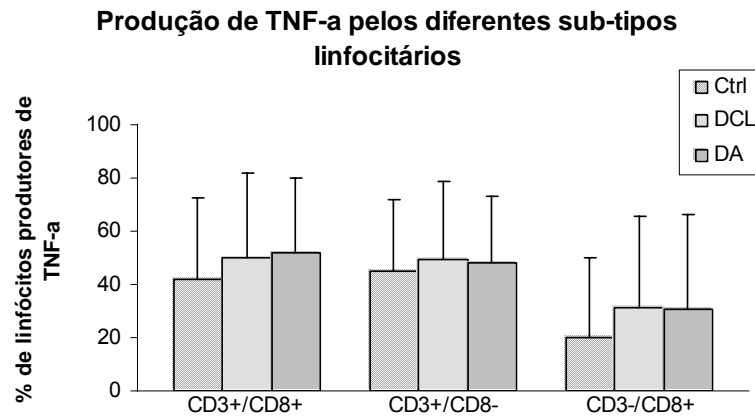
**Sub-tipos linfocitários estudados**

Figura 23. Comparação das médias das percentagens dos vários tipos de linfócitos estudados, nos grupos Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e doentes de Alzheimer (DA). Não se registou qualquer diferença significativa entre grupos.

A Figura 24 mostra que existe uma percentagem média maior dos três tipos linfocitários estudados, a produzir  $\text{TNF-}\alpha$  no grupo DCL, relativamente aos outros dois grupos. Mais uma vez o grupo DCL não apresenta níveis intermédios entre o grupo controlo e o grupo DA. Este aumento relativo na percentagem de células a produzir  $\text{TNF-}\alpha$  no grupo DCL não é acompanhado por uma maior quantidade de citocina a ser produzida. Mais especificamente, a nível dos linfócitos  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  e  $\text{CD3}^-\text{CD8}^+$ , o grupo DCL apresenta os valores de MIF mais baixos entre os três grupos.

A.



B.

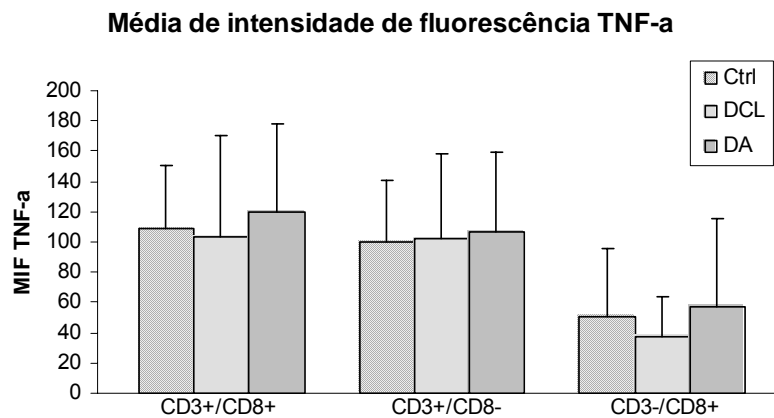


Figura 24. A- Comparação das médias das percentagens dos subtipos linfocitários produtores de TNF- $\alpha$ , entre os três grupos em estudo: Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). Não se registou qualquer diferença significativa entre grupos. B- Comparação das médias de intensidades de fluorescências do TNF- $\alpha$  dos mesmos subtipos de linfócitos entre grupos.

## 2.2. Segunda avaliação

Passados seis meses da primeira avaliação, foi realizada uma segunda avaliação dos parâmetros inflamatórios anteriormente estudados, no grupo DCL. Assim, foi determinada a média da percentagem de monócitos produtores das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ , bem como as quantidades relativas de cada citocina (Tabela XIII).

Foi também feita a análise das populações linfocitárias e da produção de TNF- $\alpha$  por estes subtipos celulares (Tabela XIV).

### 2.2.1. Determinação de citocinas em monócitos

A percentagem média de monócitos no grupo DCL nesta segunda avaliação (4,4%) é muito semelhante à percentagem obtida na primeira avaliação.

De uma maneira geral, os valores correspondentes às médias de percentagens de monócitos produtores das citocinas em estudo encontraram-se diminuídos, relativamente aos valores obtidos na primeira avaliação. À semelhança do que foi observado na primeira avaliação, existe uma maior percentagem de monócitos não activados a produzir TNF- $\alpha$ , quando em comparação com a quantidade destas células a produzir as outras três citocinas em estudo. Na primeira avaliação existe também uma maior quantidade de TNF- $\alpha$  a ser produzida, no entanto, nesta segunda avaliação existe uma maior quantidade de IL-1 $\beta$ , relativamente às outras citocinas (Tabela XIII).



**Tabela XIII- Percentagem média de monócitos produtores das citocinas em estudo e quantidades relativas de cada citocina, no grupo DCL, relativas à segunda avaliação.**

Segunda avaliação			DCL
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Não activado	%	11,1 $\pm$ 11,6
		MIF	24,5 $\pm$ 6,5
	Activado	%	71,0 $\pm$ 19,2
		MIF	475,6 $\pm$ 262,5
<b>IL-6</b>	Não activado	%	3,3 $\pm$ 5,1
		MIF	20,0 $\pm$ 4,2
	Activado	%	51,3 $\pm$ 20,1
		MIF	52,2 $\pm$ 9,8
<b>IL-12</b>	Não activado	%	1,9 $\pm$ 2,0
		MIF	17,9 $\pm$ 3,9
	Activado	%	20,0 $\pm$ 13,0
		MIF	22,6 $\pm$ 4,9
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Não activado	%	5,2 $\pm$ 5,1
		MIF	26,0 $\pm$ 16,4
	Activado	%	89,4 $\pm$ 12,8
		MIF	99,5 $\pm$ 58,5

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 2.2.2. Determinação de TNF- $\alpha$ em linfócitos

Na segunda avaliação, à semelhança do que aconteceu na primeira avaliação, os linfócitos CD3+CD8+ e CD3+CD8- apresentaram percentagens médias de produção de TNF- $\alpha$  muito semelhantes e superiores à média apresentada pelos linfócitos CD3-CD8+ (Tabela XIV). É também observado um padrão semelhante no que diz respeito às quantidades relativas desta citocina. Comparativamente com os resultados obtidos na primeira avaliação, todos os parâmetros estudados apresentam valores inferiores nesta segunda avaliação.

Tabela XIV- Análise das populações linfocitárias no grupo DCL, relativa à segunda avaliação.

Segunda avaliação		DCL
	% Linfócitos	26,2 ± 8,5
Linfócitos	CD3+/CD8+	3,7 ± 1,8
	CD3+/CD8-	14,7 ± 6,7
	CD3-/CD8-	6,8 ± 3,2
	CD3-/CD8+	1,0 ± 1,2
TNF- $\alpha$	CD3+/CD8+	% 37,3 ± 24,1
		MIF 91,5 ± 46,1
	CD3+/CD8-	% 37,6 ± 20,2
		MIF 89,0 ± 41,4
	CD3-/CD8+	% 10,2 ± 12,1
		MIF 42,0 ± 41,1

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### **2.3. Terceira avaliação**

Após um ano da primeira avaliação, foi realizada uma terceira avaliação dos parâmetros inflamatórios anteriormente estudados, no grupo DCL. Assim, foi feita uma terceira determinação da média da percentagem de monócitos produtores das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ , bem como das quantidades relativas de cada citocina (Tabela XV).

Foi também feita a análise das populações linfocitárias e da produção de TNF- $\alpha$  por estes subtipos celulares (Tabela XVI).

#### *2.3.1. Determinação de citocinas em monócitos*

A percentagem média de monócitos é mais baixa nesta terceira avaliação (4,0%), comparativamente com as duas avaliações apresentadas anteriormente. À semelhança do que foi verificado na segunda avaliação, os valores correspondentes às médias das percentagens de monócitos não activados produtores das citocinas em estudo encontraram-se diminuídos, quando em comparação com os valores das avaliações anteriores (Tabela XV).

No que concerne à citocina produzida em maior quantidade, esta terceira avaliação é em tudo semelhante à primeira, ou seja, há uma percentagem média de monócitos produtores de TNF- $\alpha$  superior, quando em comparação com as restantes citocinas e as médias de intensidade de fluorescência associadas a esta citocina são também superiores.

**Tabela XV- Percentagem média de monócitos produtores das citocinas em estudo e quantidades relativas de cada citocina, no grupo DCL, relativas à terceira avaliação.**

Terceira avaliação			DCL
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Não activado	%	4,3 $\pm$ 5,1
		MIF	26,4 $\pm$ 15,2
	Activado	%	74,4 $\pm$ 15,2
		MIF	421,1 $\pm$ 237,4
<b>IL-6</b>	Não activado	%	1,9 $\pm$ 3,5
		MIF	21,7 $\pm$ 9,3
	Activado	%	66,9 $\pm$ 18,1
		MIF	67,7 $\pm$ 27,2
<b>IL-12</b>	Não activado	%	1,0 $\pm$ 0,6
		MIF	17,2 $\pm$ 4,7
	Activado	%	28,0 $\pm$ 13,0
		MIF	21,9 $\pm$ 5,6
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Não activado	%	3,1 $\pm$ 4,2
		MIF	22,9 $\pm$ 11,0
	Activado	%	95,2 $\pm$ 5,3
		MIF	77,6 $\pm$ 19,3

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 2.3.2. Determinação de TNF- $\alpha$ em linfócitos

À semelhança do que aconteceu nas avaliações anteriores, os valores apresentados na Tabela XVI permitem-nos observar que o subtipo linfocitário presente em maior quantidade corresponde aos linfócitos CD3+CD8-, enquanto os linfócitos CD3-CD8+ representam uma sub-população mais pequena. De uma maneira geral, nas três avaliações, as proporções das quatro sub-populações estudadas mantêm-se.

A percentagem dos vários subtipos de linfócitos produtores de TNF- $\alpha$  é mais baixa nesta terceira avaliação, quando em comparação com as duas avaliações anteriores. O mesmo pode ser observado relativamente à quantidade relativa desta citocina.

**Tabela XVI- Análise das populações linfocitárias no grupo DCL, relativa à terceira avaliação.**

Terceira avaliação		DCL
	% Linfócitos	28,6 ± 2,6
Linfócitos	CD3+/CD8+	5,2 ± 2,6
	CD3+/CD8-	16,2 ± 6,1
	CD3-/CD8-	5,9 ± 2,7
	CD3-/CD8+	1,4 ± 1,0
TNF- $\alpha$	CD3+/CD8+	% 16,9 ± 28,4
		MIF 50,5 ± 35,2
	CD3+/CD8-	% 14,5 ± 19,1
		MIF 51,9 ± 35,5
	CD3-/CD8+	% 3,7 ± 5,5
		MIF 27,1 ± 25,5

Os resultados são apresentados como médias ± desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

## 2.4. Análise longitudinal

Uma vez que não foi possível efectuar uma análise estatística aos dados apresentados para as três avaliações, foi feita uma análise gráfica dos resultados correspondentes aos parâmetros inflamatórios nas três avaliações. Assim, os gráficos a seguir apresentados representam os valores dos vários parâmetros estudados ao longo do tempo, relativamente ao grupo DCL. T1 corresponde à primeira avaliação, T2 à segunda avaliação (aos seis meses) e T3 à terceira avaliação (aos 12 meses). Os resultados obtidos para o grupo DCL são comparados com os valores, para cada um dos outros dois grupos, obtidos na primeira avaliação.

### 2.4.1. Monócitos

De uma maneira geral, à excepção do TNF- $\alpha$ , a percentagem de monócitos não activados produtores das citocinas em estudo tem tendência para diminuir ao longo do tempo, apresentando uma diminuição mais acentuada entre as primeiras e segundas avaliações do que entre as segundas e terceiras.

A percentagem de monócitos activados a produzir TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 apresenta também uma tendência para diminuir ao longo do tempo. No entanto estes valores diminuem sempre entre as três avaliações relativas ao TNF- $\alpha$ , no entanto a nível da IL-6 e da IL-12, após a segunda avaliação dá-se um aumento na percentagem de monócitos produtores destas citocinas após estimulação. A IL-1 $\beta$  apresenta um padrão contrário com aumento da percentagem média destes monócitos, ao longo do tempo.

As quantidades relativas das várias citocinas estudadas, tanto a nível fisiológico como após activação, apresentam também um padrão semelhante com tendência para uma diminuição mais acentuada entre as duas primeiras avaliações (Figuras 25 a 28).

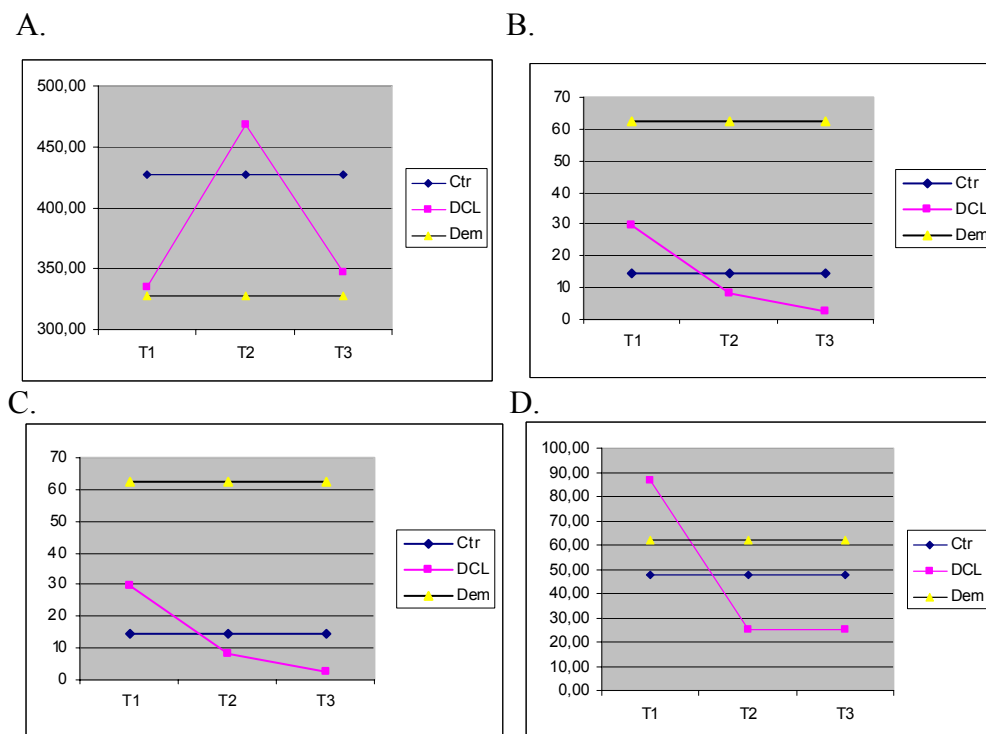


Figura 25. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de monócitos produtores de TNF- $\alpha$  (A, B) e à média de intensidade de fluorescência obtida para esta citocina (C, D). Os gráficos A e C representam os ensaios em células não activadas, enquanto B e D mostram os ensaios com estimulação com LPS durante 6 horas (B, D).

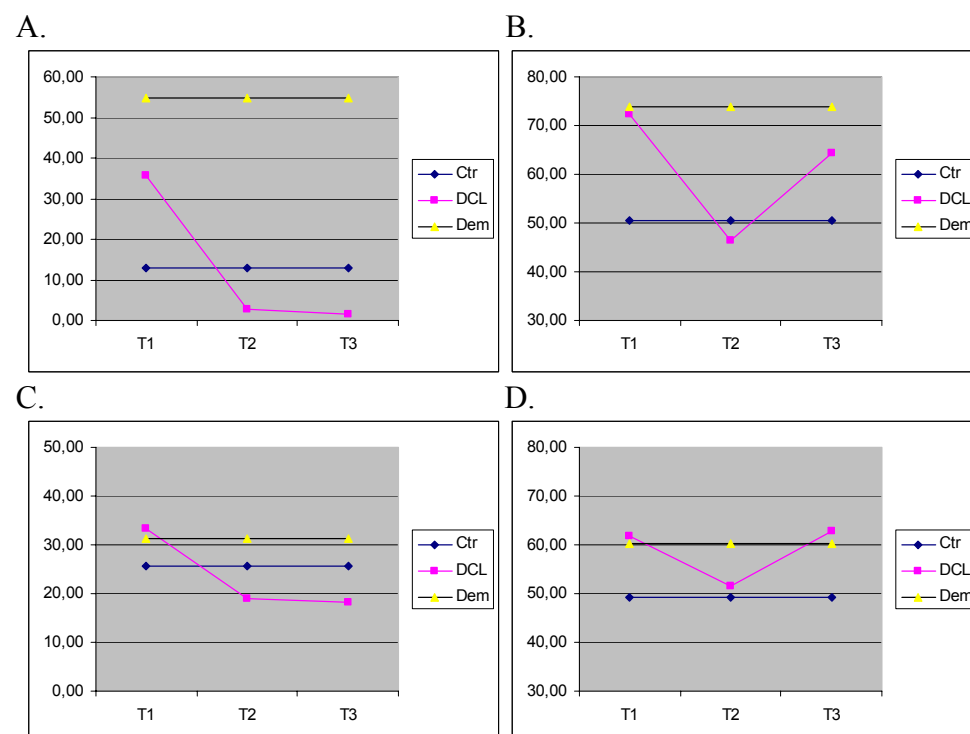


Figura 26. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de monócitos produtores de IL-6 (A, B) e à média de intensidade de fluorescência obtida para esta citocina (C, D). Os gráficos A e C representam os ensaios em células não activadas, enquanto B e D mostram os ensaios com estimulação com LPS durante 6 horas (B, D).

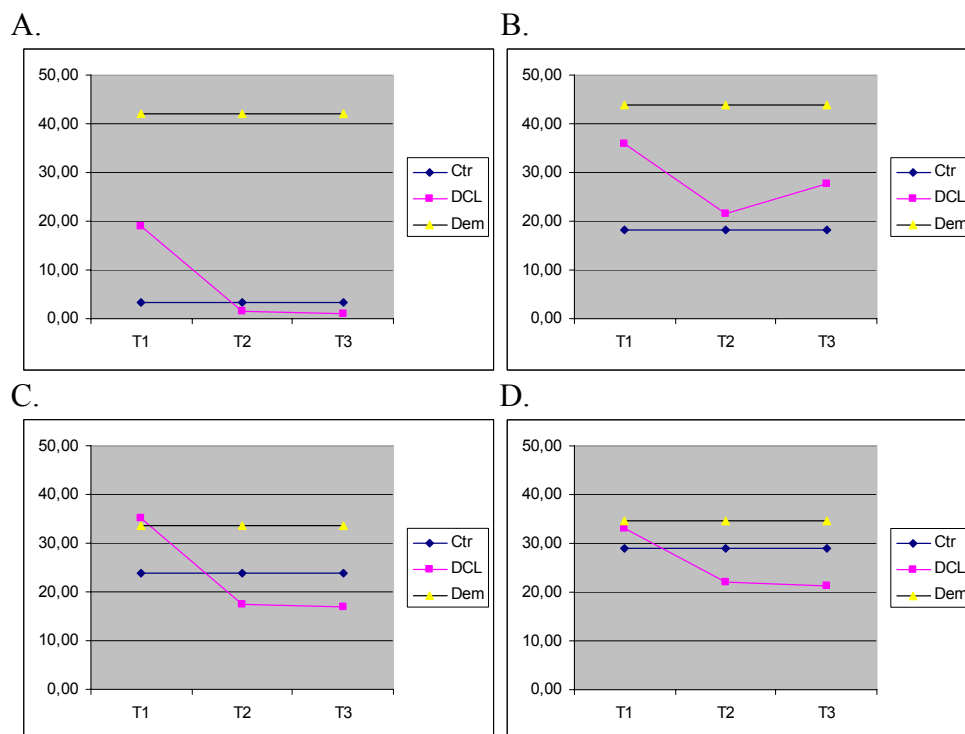


Figura 27. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de monócitos produtores de IL-12 (A, B) e à média de intensidade de fluorescência obtida para esta citocina (C, D). Os gráficos A e C representam os ensaios em células não activadas, enquanto B e D mostram os ensaios com estimulação com LPS durante 6 horas (B, D).

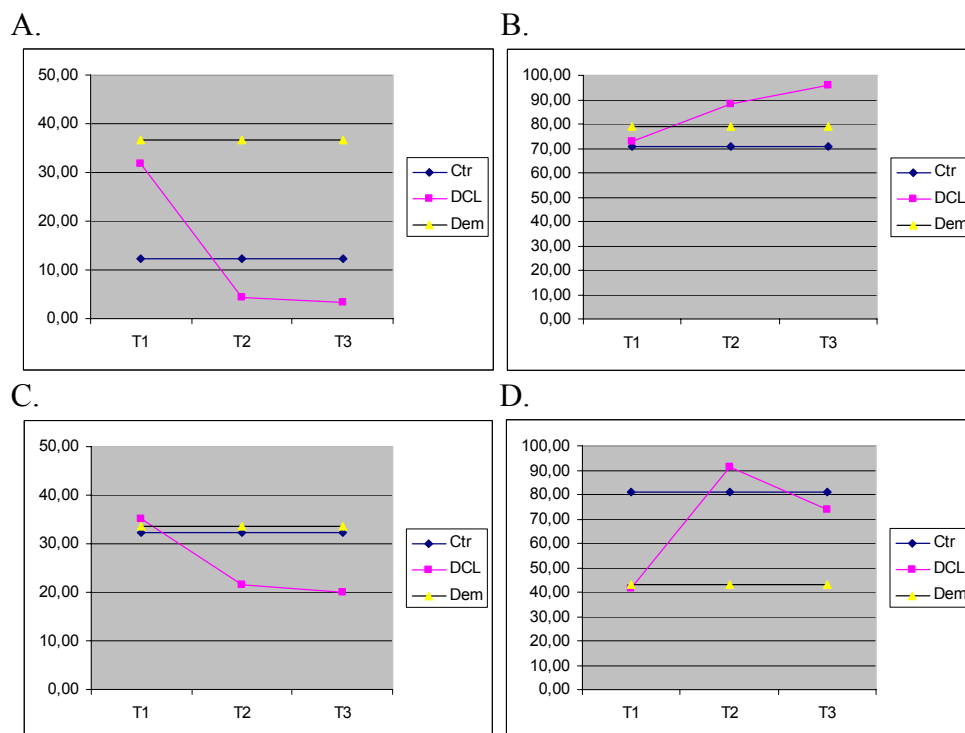


Figura 28. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de monócitos produtores de IL-1β (A, B) e à média de intensidade de fluorescência obtida para esta citocina (C, D). Os gráficos A e C representam os ensaios em células não activadas, enquanto B e D mostram os ensaios com estimulação com LPS durante 6 horas (B, D).



## 2.4.2. Linfócitos

A nível linfocitário parece haver uma tendência para a diminuição dos tipos celulares estudados, ao longo do tempo. À excepção das células CD3-CD8- que diminuem continuamente ao longo das três avaliações, os outros três subtipos linfocitários apresentam valores mais elevados na terceira avaliação quando em comparação com a segunda avaliação (Figura 29).

A Figura 30 apresenta padrões muito semelhantes para os subtipos linfocitários produtores de TNF- $\alpha$ , padrões estes que realçam uma diminuição acentuada quer da percentagem de células produtoras desta citocina, como das quantidades relativas de TNF- $\alpha$ .

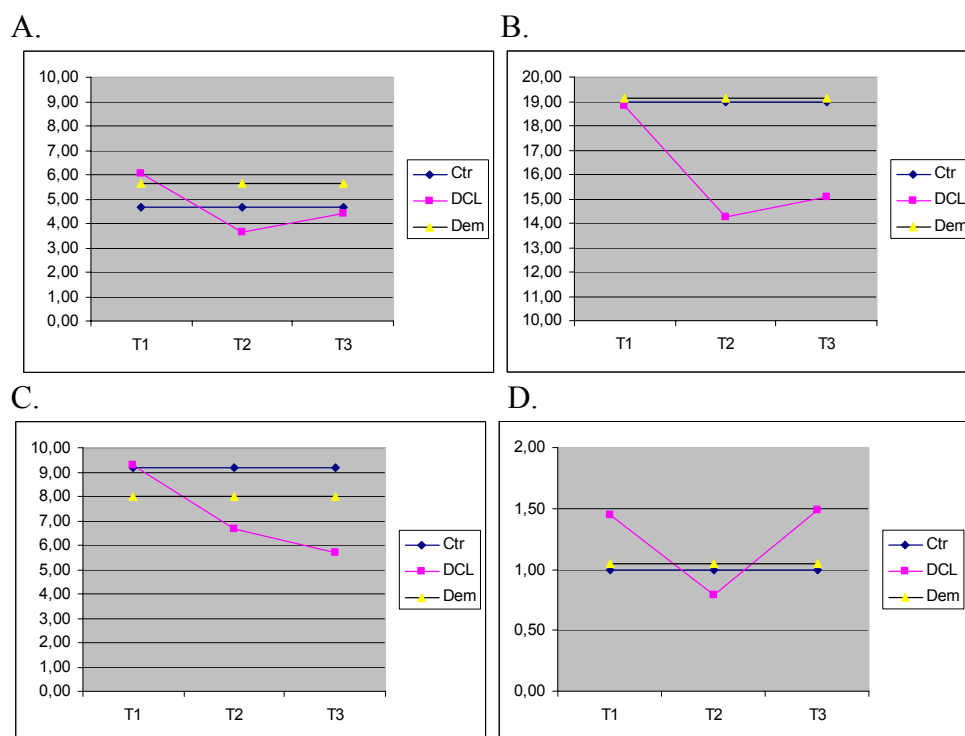


Figura 29. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem dos vários tipos de linfócitos. A- linfócitos CD3+/CD8+; B- linfócitos CD3+/CD8-; C- linfócitos CD3-/CD8-; D- linfócitos CD3-/CD8+.

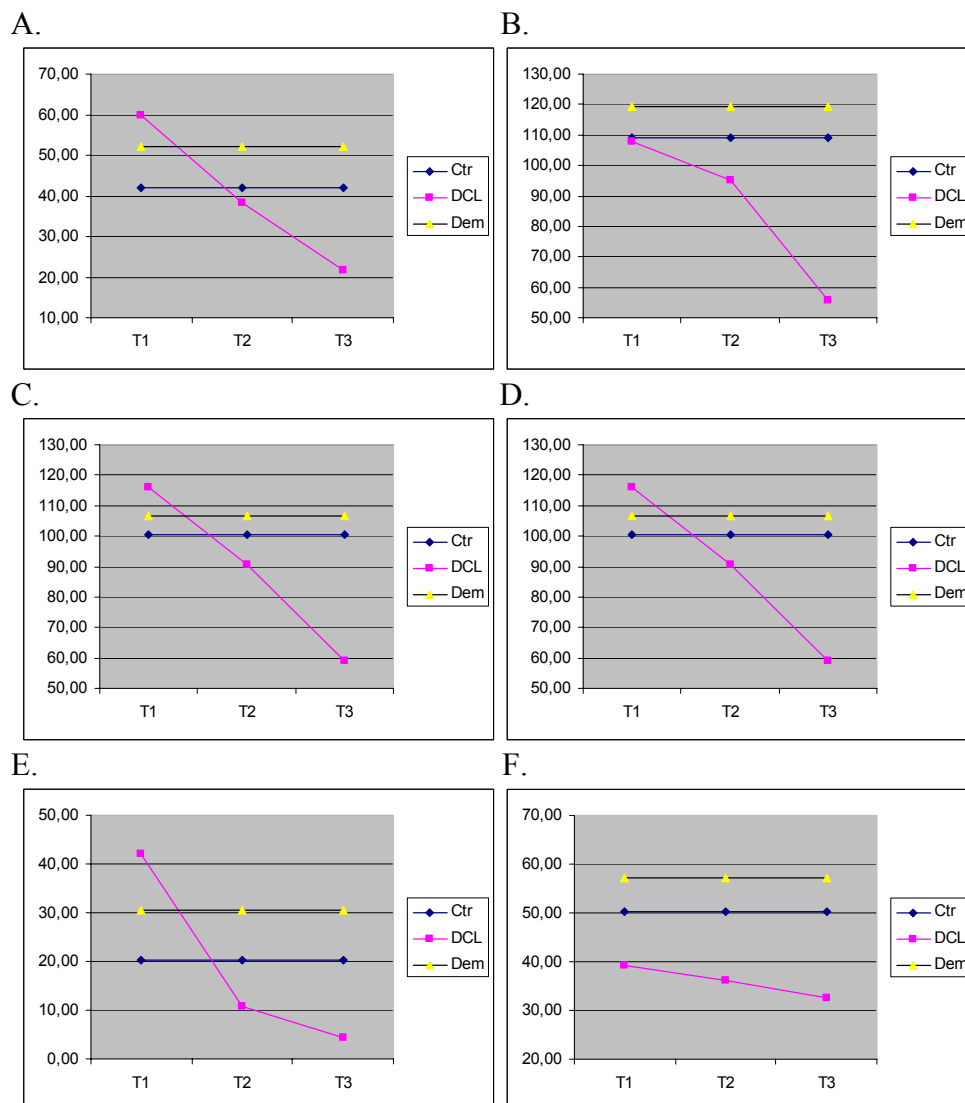


Figura 30. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem dos vários tipos de linfócitos produtores de TNF- $\alpha$  (A, C, E) e à média de intensidades de fluorescência associada a esta citocina (B, D, F). Os gráficos A e B representam os linfócitos CD3+/CD8+; os gráficos C e D mostram os valores relativos aos linfócitos CD3+/CD8- e os gráficos E e F os valores associados aos linfócitos CD3-/CD8+.

### 3. Parâmetros de morte celular

#### 3.1. Primeira avaliação

##### 3.1.1. Expressão das proteínas Bax e Bcl2

Na análise da expressão das proteínas Bax e Bcl2 foram determinadas as percentagens de granulócitos, de monócitos e de linfócitos B, T e NK, relativamente à população celular total, após remoção dos fragmentos eritrocitários. Posteriormente, os linfócitos foram identificados com base nas suas características únicas de FSC/SSC, tendo sido determinada a média de intensidade de fluorescência associada às proteínas Bax e a Bcl2 em cada um destes tipos celulares.

Na Tabela XVII são apresentados os valores relativos às determinações referidas em cima. A comparação dos valores obtidos para os três grupos em estudo revelou a existência de uma diferença significativa na percentagem de linfócitos de B entre os grupos DA e controlo.

**Tabela XVII- Expressão das proteínas Bax e Bcl2 nos três grupos em estudo.**

%	<i>Granulócitos</i>		<i>Monócitos</i>		<i>Linfócitos B</i>		<i>Linfócitos T</i>		<i>Linfócitos NK</i>	
<b>DCL</b>	55,30 ± 8,89		7,65 ± 3,35		9,73 ± 4,32		73,46 ± 8,80		16,57 ± 8,04	
<b>DA</b>	54,70 ± 11,50		6,66 ± 2,65		8,84 ± 3,26 *		72,49 ± 7,35		18,18 ± 8,07	
<b>Ctrl</b>	48,49 ± 10,97		8,85 ± 7,80		12,29 ± 4,10		69,93 ± 8,44		17,52 ± 7,50	
<i>MFI</i>	<i>Bcl2</i> <i>Bax</i>		<i>Bcl2</i> <i>Bax</i>		<i>Bcl2</i> <i>Bax</i>		<i>Bcl2</i> <i>Bax</i>		<i>Bcl2</i> <i>Bax</i>	
<b>DCL</b>	36,54 ±	84,07 ±	112,10 ±	68,44 ±	109,08 ±	37,30 ±	177,35 ±	27,67 ±	115,22 ±	37,36 ±
	10,72	68,82	44,44	56,49	29,35	34,02	43,23	11,87	31,15	34,32
<b>DA</b>	33,44 ±	70,16 ±	99,64 ±	66,35 ±	98,78 ±	32,36 ±	154,37 ±	31,75 ±	99,07 ±	31,52 ±
	9,77	33,76	48,93	29,34	30,01	18,10	54,18	17,04	39,50	18,45
<b>Ctrl</b>	41,63 ±	63,62 ±	118,85 ±	50,85 ±	101,34 ±	20,72 ±	169,75 ±	23,23 ±	111,50 ±	20,49 ±
	16,87	44,78	40,66	23,41	22,16	8,97	30,19	11,37	28,98	11,13

Os resultados são apresentados como médias ± desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Doença de Alzheimer; Ctrl – Grupo controlo; \* p<0,05 quando comparados os grupos controlo e DA.

Os granulócitos são o tipo leucocitário presente em maior quantidade no sangue, seguidos dos linfócitos e, por último, dos monócitos. Enquanto a nível destes dois últimos tipos celulares os valores apresentados pelo grupo DCL se situam entre os valores apresentados pelos outros dois grupos, o mesmo não acontece com os granulócitos, onde o grupo DCL apresenta a percentagem mais elevada (Figura 31).

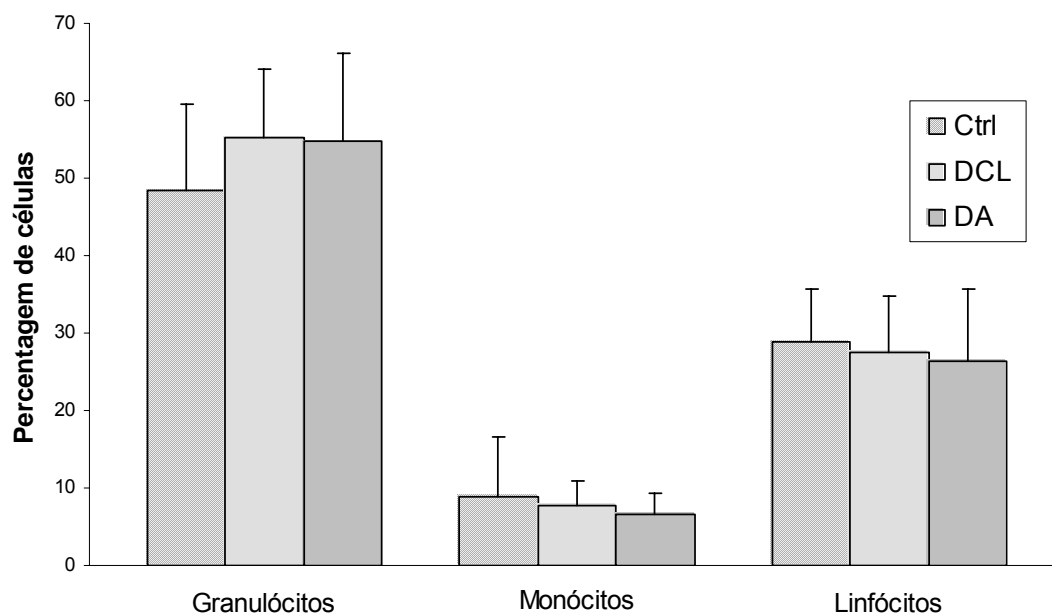


Figura 31. Comparação das médias das percentagens de granulócitos, monócitos e linfócitos entre os grupos controlo, DCL e DA. Os resultados são apresentados em forma de médias  $\pm$  desvios-padrão.

A Figura 32 mostra claramente que, relativamente aos três subtipos linfocitários estudados, o grupo DCL apresenta os valores mais elevados a nível dos linfócitos T, os valores mais baixos a nível dos linfócitos NK e valores intermédios entre os outros dois grupos a nível dos linfócitos B. A percentagem média destas células é significativamente diferente entre o grupo controlo e o grupo de indivíduos com doença de Alzheimer.

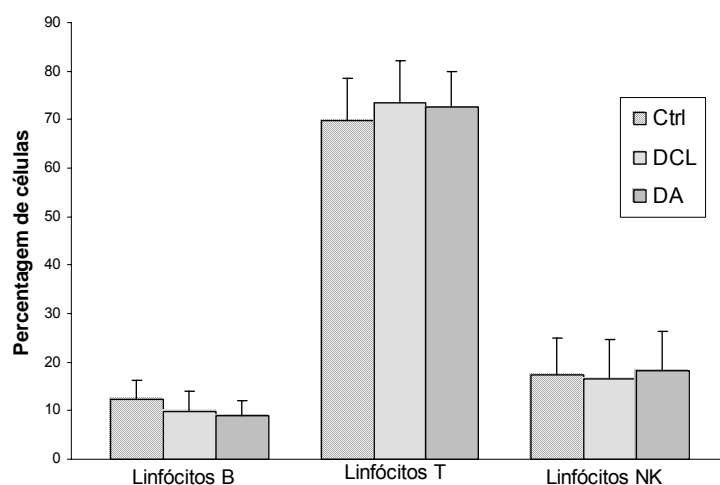


Figura 32. Comparação das médias das percentagens de cada subtipo linfocitário estudado entre os grupos controlo, DCL e DA. Os resultados são apresentados em forma de médias  $\pm$  desvios-padrão.

O grupo DCL apresenta níveis médios mais elevados de expressão das proteínas Bax e Bcl2 nos linfócitos B e nos linfócitos NK (Figuras 33 e 35). No entanto, nos linfócitos T isto verifica-se para os níveis de expressão de Bcl2, mas não para os níveis de Bax. Relativamente a esta proteína, o grupo DCL apresenta valores intermédios entre o grupo controlo que apresenta os valores mais baixos e o grupo DA que apresenta os valores mais elevados (Figura 34).

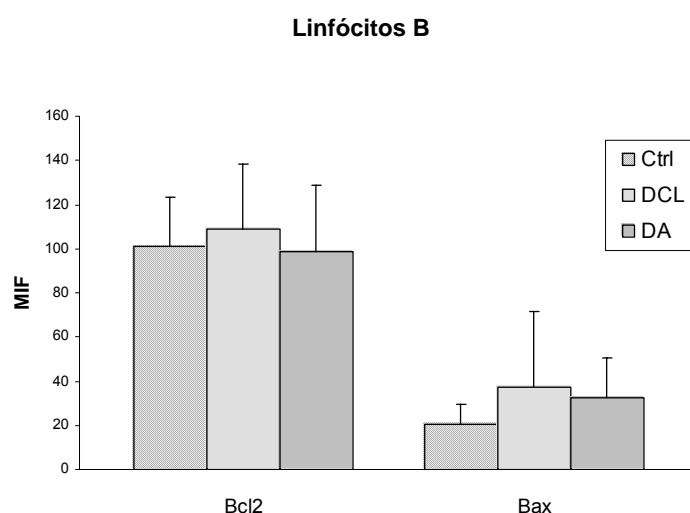


Figura 33. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos B entre os grupos controlo, DCL e DA. Os resultados são apresentados na forma de médias  $\pm$  desvios-padrão.

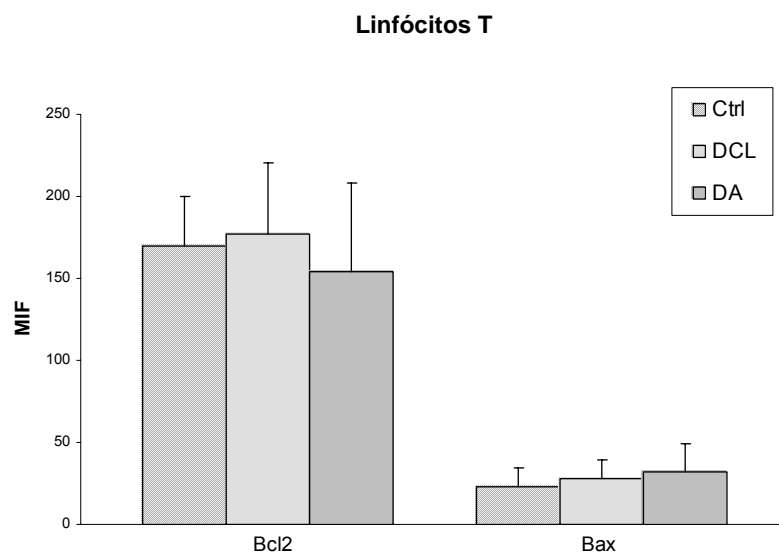


Figura 34. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos T entre entre os grupos controle, DCL e DA. Os resultados são apresentados na forma de médias  $\pm$  desvios-padrão.

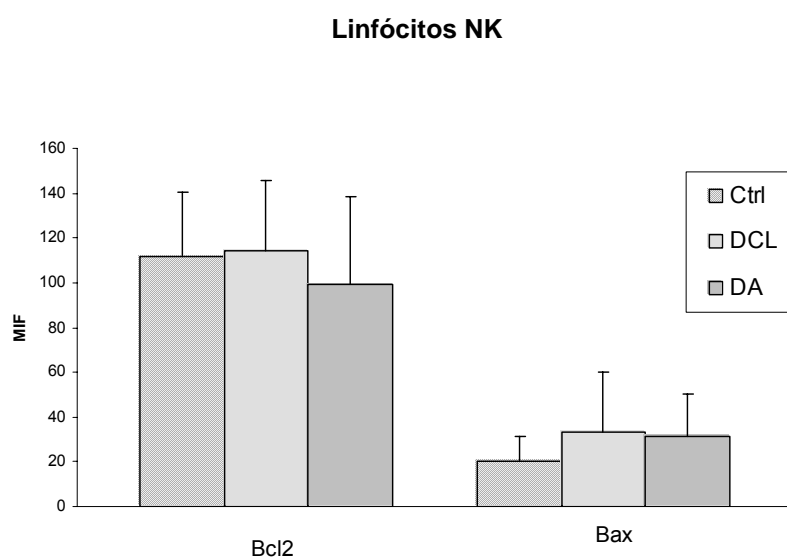


Figura 35. Comparação da expressão de Bcl2 e Bax pelos linfócitos NK entre entre os grupos controle, DCL e DA. Os resultados são apresentados na forma de médias  $\pm$  desvios-padrão.

### 3.1.2. Expressão das proteínas Fas e FasL

Na análise da expressão das proteínas Fas e FasL foram determinadas as médias das percentagens de linfócitos B, T e NK que expressam cada uma destas proteínas, após realização de um *gate* em linfócitos, com base nas suas características únicas de FSC/SSC.

Assim, foram determinadas as médias das percentagens de cada subtipo linfocitário a expressar Fas e FasL, bem como a média de intensidade de fluorescência associada a cada uma.

Na Tabela XVIII são apresentadas as médias e respectivos desvios padrão relativos a cada uma destas análises, para os três grupos estudados.

Não foram encontradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros em estudo, entre os três grupos.

**Tabela XVIII- Percentagem dos subtipos de linfócitos que expressam Fas e FasL em DA, DCL e controles.**

	<i>Linfócitos B</i>				<i>Linfócitos T</i>				<i>Linfócitos NK</i>			
	FASL		FAS		FASL		FAS		FASL		FAS	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
<b>DCL</b>	10,2 ±	34,7 ±	9,2 ±	29,4 ±	2,8 ±	11,7 ±	79,7 ±	31,3 ±	0,7 ±	38,4 ±	58,8 ±	15,6 ±
	14,4	23,6	6,0	10,0	15,2	16,2	13,6	8,8	1,1	64,4	23,9	6,9
<b>DA</b>	6,7 ±	31,4 ±	12,3 ±	28,2 ±	1,0 ±	7,0 ±	80,8 ±	28,1 ±	0,5 ±	35,5 ±	56,5 ±	14,0 ±
	5,1	37,1	11,9	13,0	4,7	16,2	14,1	6,8	0,7	43,3	24,7	4,3
<b>Ctrl</b>	9,3 ±	28,7 ±	17,6 ±	20,2 ±	62,8 ±	20,3 ±	48,0 ±	18,5 ±	26,3 ±	27,8 ±	33,4 ±	11,6 ±
	2,8	8,6	8,6	6,5	53,3	9,6	23,7	8,1	20,0	15,3	17,2	5,0

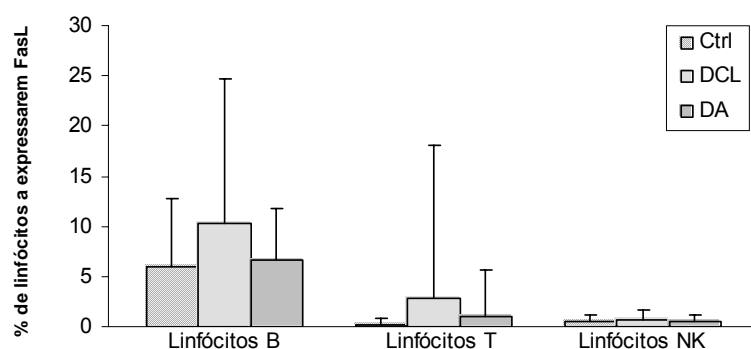
Os resultados são apresentados como médias ± desvios-padrão. % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro; DA – Doença de Alzheimer; Ctrl – Grupo controlo.

A nível da percentagem de células a expressarem a proteína FasL, o grupo DCL apresenta os valores mais elevados entre os três grupos. O mesmo se verifica para a quantidade desta proteína expressa por linfócitos T e NK. No entanto, a nível dos linfócitos T, este grupo apresenta os valores mais baixos (Figura 36).

Os linfócitos B são o subtipo linfocitário cuja percentagem de células a expressarem esta proteína é superior. A nível das quantidades relativas de FasL, os níveis expressos por linfócitos B e NK são semelhantes, enquanto as quantidades expressas por linfócitos T são muito inferiores.

A.

#### Sub-tipos linfocitários que expressam FasL



B.

#### Média de intensidade de fluorescência FasL

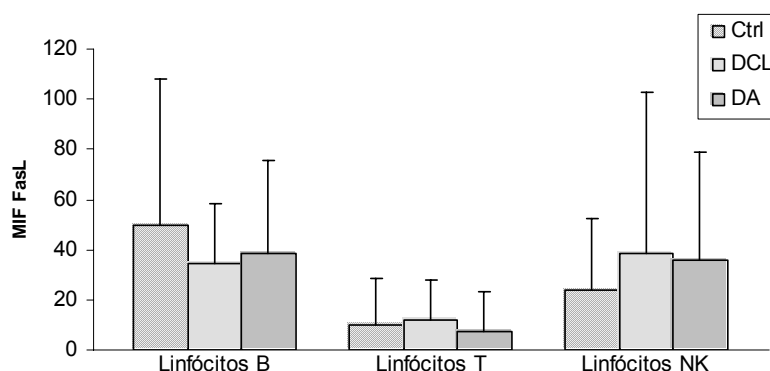
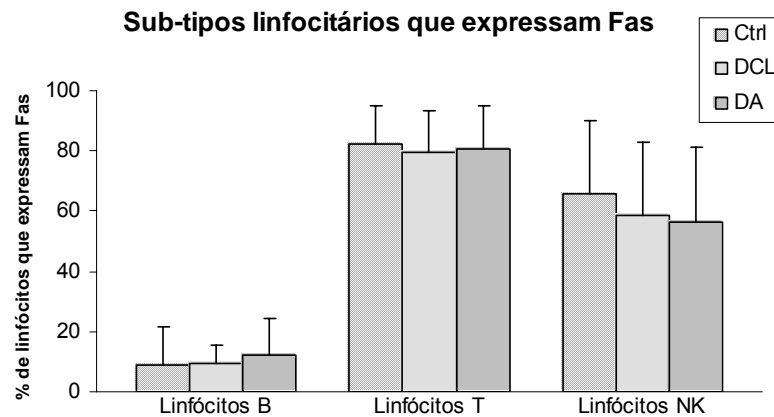


Figura 36. A- Comparação das médias das percentagens dos subtipos linfocitários que expressam FasL, entre os três grupos em estudo: Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B- Comparação das médias de intensidade de fluorescência da proteína FasL, entre os três grupos em estudo.



As percentagens médias de linfócitos a expressarem a proteína Fas são semelhantes entre os três grupos. A percentagem de linfócitos B a expressarem esta proteína é muito inferior quando comparada com os linfócitos T e NK. No entanto, este subtipo linfocitário expressa uma maior quantidade de Fas do que os linfócitos NK (Figura 37).

A.



B.

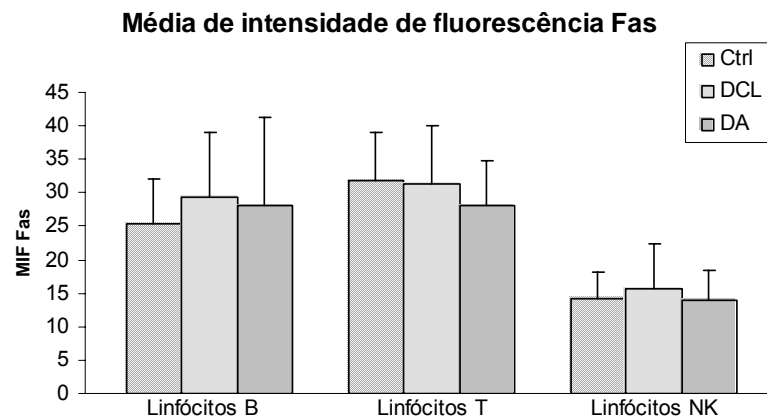


Figura 37. A. Comparação das médias das percentagens dos subtipos linfocitários que expressam a proteína Fas, entre os três grupos em estudo: Controlo (Ctrl), Defeito Cognitivo Ligeiro (DCL) e Doentes de Alzheimer (DA). B. Comparação das médias de intensidade de fluorescência da proteína Fas, entre os três grupos em estudo.

### 3.2. Segunda avaliação

Passados seis meses da primeira avaliação, foi realizada uma segunda avaliação dos parâmetros relacionados com a expressão de proteínas envolvidas em processos de morte celular, no grupo DCL. Assim, foram determinadas as percentagens médias de granulócitos, monócitos e linfócitos B, T e NK, bem como as quantidades de Bax e Bcl2 expressas por cada um destes tipos celulares (Tabela XIX).

Foi também feita a análise da expressão das proteínas Fas e FasL pelos linfócitos B, T e NK (Tabela XX).

#### 3.2.1. Expressão das proteínas Bax e Bcl2

Através da observação dos valores apresentados na Tabela XIX pode concluir-se que os resultados obtidos relativamente à percentagem de cada tipo celular não diferem muito comparativamente aos da primeira avaliação (Tabela XVII). Os granulócitos apresentam, à semelhança do que aconteceu na primeira avaliação, os valores mais elevados de expressão de Bax e, ao mesmo tempo, os valores mais reduzidos de expressão de Bcl2.

**Tabela XIX- Análise da expressão das proteínas Bax e Bcl2, relativa à segunda avaliação.**

<i>DCL</i>	<i>Granulócitos</i>		<i>Monócitos</i>		<i>Linfócitos B</i>		<i>Linfócitos T</i>		<i>Linfócitos NK</i>	
%	56,7 ± 7,7		7,2 ± 2,1		10,1 ± 4,9		70,8 ± 10,1		18,6 ± 9,2	
MFI	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax
Média	36,1 ± 8,6	69,6 ±	135,7 ±	53,7 ±	114,2 ±	25,3 ±	199,0 ±	23,8 ±	128,3 ±	26,3 ±
± DP		33,3	34,8	27,8	18,3	11,9	31,6	9,0	22,9	23,3

DP – Desvio padrão; % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 3.2.2. Expressão das proteínas Fas e FasL

Os valores presentes na Tabela XX, relativos à análise da expressão das proteínas Fas e FasL na segunda avaliação do grupo DCL, são relativamente diferentes daqueles encontrados na primeira avaliação. Apesar disso, a percentagem de linfócitos B a expressar FasL continua a ser a mais elevada, enquanto a percentagem deste tipo linfocitário a expressar Fas continua a ser a mais reduzida.

**Tabela XX- Análise da expressão das proteínas Fas e FasL, relativa à segunda avaliação.**

DCL	Linfócitos B				Linfócitos T				Linfócitos NK			
	FASL		FAS		FASL		FAS		FASL		FAS	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
Média	7,6 ±	43,9 ±	13,2 ±	32,4 ±	0,2 ±	23,4 ±	87,4 ±	36,1 ±	0,8 ±	43,5 ±	76,1 ±	17,0 ±
± DP	5,2	46,0	5,3	8,1	0,5	34,5	9,4	6,2	1,1	41,1	20,8	4,9

DP – Desvio padrão; % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 3.3. Terceira avaliação

Um ano depois da primeira avaliação, foi realizada uma terceira avaliação dos parâmetros relacionados com a expressão de proteínas envolvidas em processos de morte celular, no grupo DCL. Foram determinadas as percentagens médias de granulócitos, monócitos e linfócitos B, T e NK, bem como as quantidades de Bax e Bcl2 expressas por cada um destes tipos celulares (Tabela XXI).

Foi também feita a análise da expressão das proteínas Fas e FasL nos mesmos subtipos linfocitários referidos (Tabela XXII).

#### 3.3.1. Expressão das proteínas Bax e Bcl2

Os resultados obtidos para a terceira avaliação da expressão das proteínas Bax e Bcl2 podem ser observados na Tabela XXI, onde se pode concluir que não existem diferenças significativas comparativamente aos das duas primeiras avaliações.

**Tabela XXI- Análise da expressão das proteínas Bax e Bcl2, relativa à terceira avaliação.**

<i>DCL</i>	<i>Granulócitos</i>		<i>Monócitos</i>		<i>Linfócitos B</i>		<i>Linfócitos T</i>		<i>Linfócitos NK</i>	
<b>%</b>	52,7 ± 7,1		6,8 ± 1,8		10,2 ± 5,0		72,4 ± 9,6		16,7 ± 8,9	
<b>MFI</b>	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax	Bcl2	Bax
<b>Média</b>	45,5 ±	124,9 ±	112,6 ±	16,1 ±	112,6 ±	16,1 ±	182,7 ±	18,1 ±	120,8 ±	15,0 ±
<b>± DP</b>	22,3	37,2	27,4	7,2	27,4	7,2	23,7	8,1	16,5	6,2

DP – Desvio padrão; % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 3.3.2. Expressão das proteínas Fas e FasL

Os resultados obtidos para a terceira avaliação da expressão das proteínas Fas e FasL podem ser observados na Tabela XXII.

**Tabela XXII- Análise da expressão das proteínas Fas e FasL, relativa à terceira avaliação.**

<i>DCL</i>	<i>Linfócitos B</i>				<i>Linfócitos T</i>				<i>Linfócitos NK</i>			
	FASL		FAS		FASL		FAS		FASL		FAS	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
<b>Média</b>	6,2 ±	46,0 ±	13,6 ±	31,9 ±	0,2 ±	23,1 ±	75,9 ±	42,5 ±	0,4 ±	41,9 ±	45,8 ±	23,1 ±
<b>± DP</b>	4,7	50,6	7,6	8,2	0,2	15,6	11,5	6,0	0,4	70,0	18,3	8,9

DP – Desvio padrão; % - Percentagem; MFI – Média de Intensidade de Fluorescência; NK – *Natural Killer*; DCL – Defeito Cognitivo Ligeiro.

### 3.4. Análise longitudinal

Uma vez que não foi possível efectuar uma análise estatística aos dados apresentados para as três avaliações, foi feita uma análise gráfica dos resultados correspondentes aos parâmetros relativos à expressão das proteínas Bax/Bcl2 e Fas/FasL nas três avaliações. Assim, os gráficos a seguir apresentados representam os valores dos vários parâmetros estudados ao longo do tempo, relativamente ao grupo DCL. T1 corresponde à primeira avaliação, T2 à segunda avaliação (seis meses) e T3 à terceira avaliação (12 meses). Os resultados obtidos para o grupo DCL são comparados com os valores, para cada um dos outros dois grupos, obtidos na primeira avaliação.

#### 3.4.1. Expressão das proteínas Bax e Bcl2

A percentagem de linfócitos B e de linfócitos T quase não se alterou ao longo do tempo. Pelo contrário a percentagem de linfócitos NK sofreu uma descida acentuada entre as duas primeiras avaliações para voltar a subir no terceiro tempo (Figura 38).

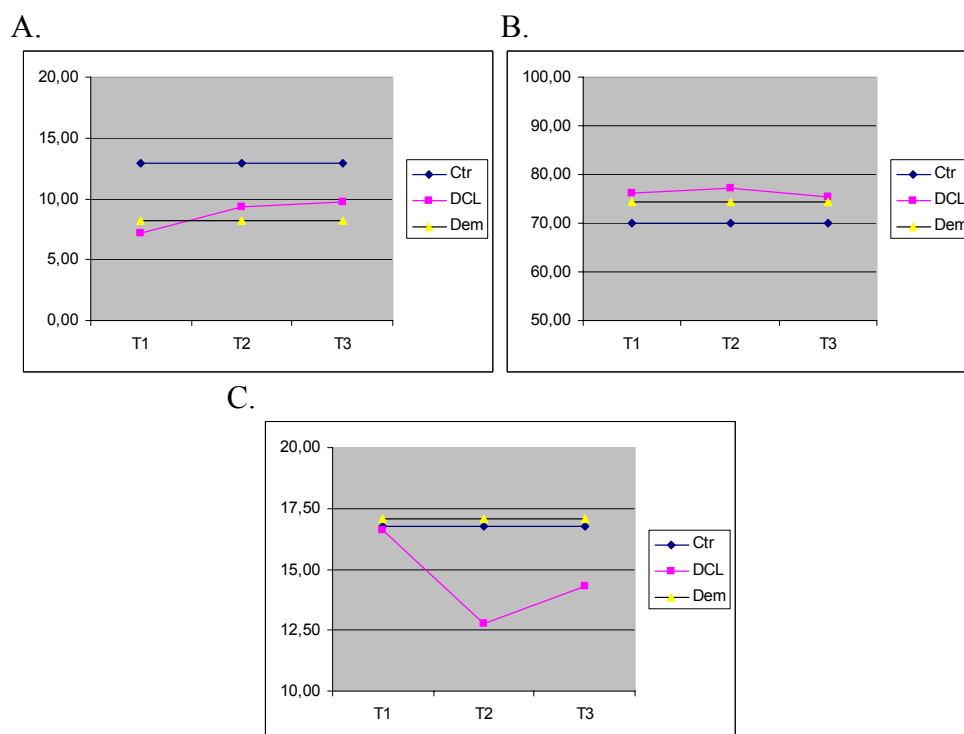


Figura 38. Percentagem dos vários subtipos linfocitários estudados no grupo DCL ao longo do tempo. A- percentagem de linfócitos B; B- percentagem de linfócitos T; C- percentagem de linfócitos NK.

De uma maneira geral as quantidades médias de Bcl2, ao longo do tempo apresentaram uma tendência para aumentarem nos vários tipos celulares estudados, à exceção dos granulócitos. Pelo contrário, as quantidades relativas da proteína Bax apresentaram uma descida acentuada ao longo dos três tempos de avaliação (Figuras 30 a 43). As variações das quantidades de Bcl2 ao longo do tempo não sofreram alterações tão marcadas como aquelas registadas para a proteína Bax.

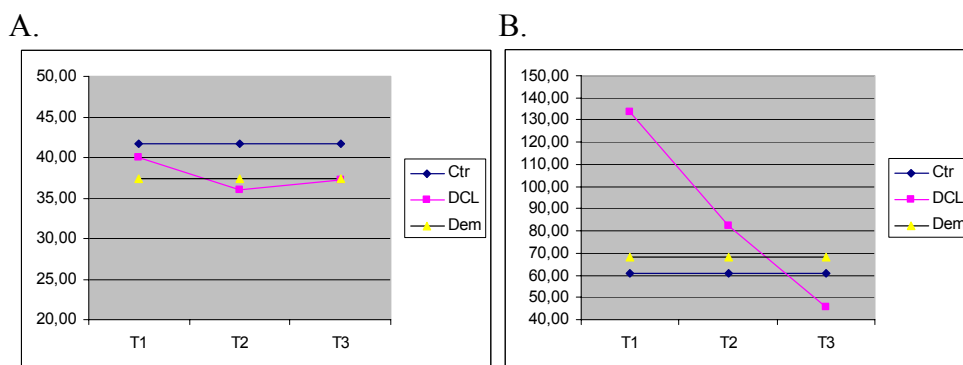


Figura 39. Quantidades médias (MIF) de Bcl2 (A) e Bax (B) expressas por granulócitos no grupo DCL ao longo do tempo.

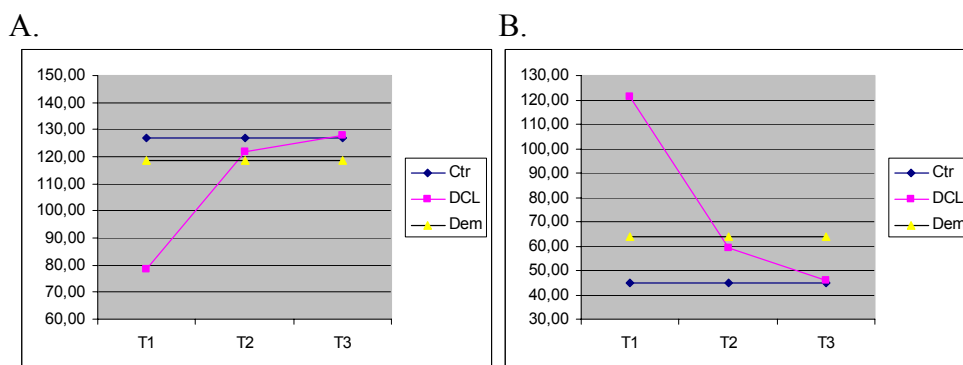


Figura 40. Quantidades médias (MIF) de Bcl2 (A) e Bax (B) expressas por monócitos no grupo DCL ao longo do tempo.

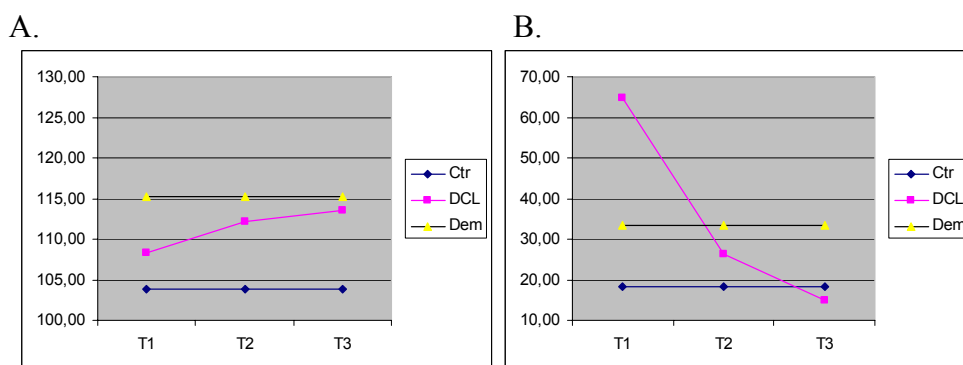


Figura 41. Quantidades médias (MIF) de Bcl2 (A) e Bax (B) expressas por linfócitos B no grupo DCL ao longo do tempo.

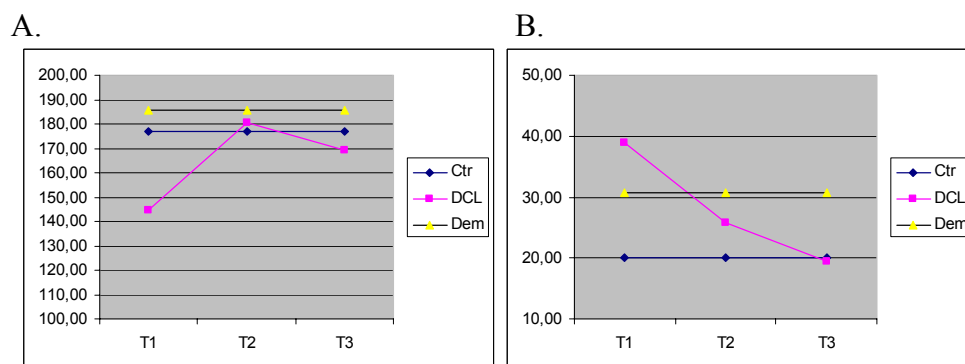


Figura 42. Quantidades médias (MIF) de Bcl2 (A) e Bax (B) expressas por linfócitos T no grupo DCL ao longo do tempo.

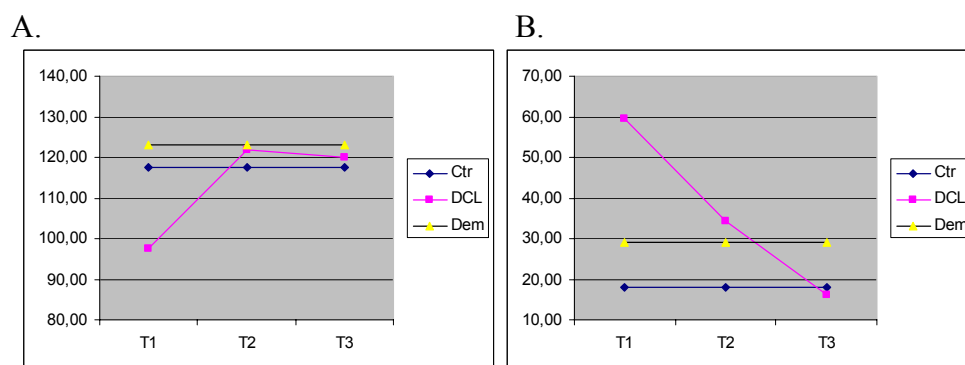


Figura 43. Quantidades médias (MIF) de Bcl2 (A) e Bax (B) expressas por linfócitos NK no grupo DCL ao longo do tempo.



### 3.4.2. Expressão das proteínas Fas e FasL

A média da percentagem de linfócitos B que expressam FasL tem uma tendência contínua para diminuir ao longo dos três tempos de avaliação, enquanto as quantidades médias desta proteína apresentam um aumento entre as duas primeiras avaliações e uma diminuição entre a segunda e a terceira avaliação.

Tanto a percentagem deste tipo de células linfocitárias a expressarem Fas, como a quantidade desta proteína, apresentam um aumento ao longo das três avaliações (Figura 44).

De uma maneira geral não são observadas variações acentuadas entre os valores registados nas três avaliações.

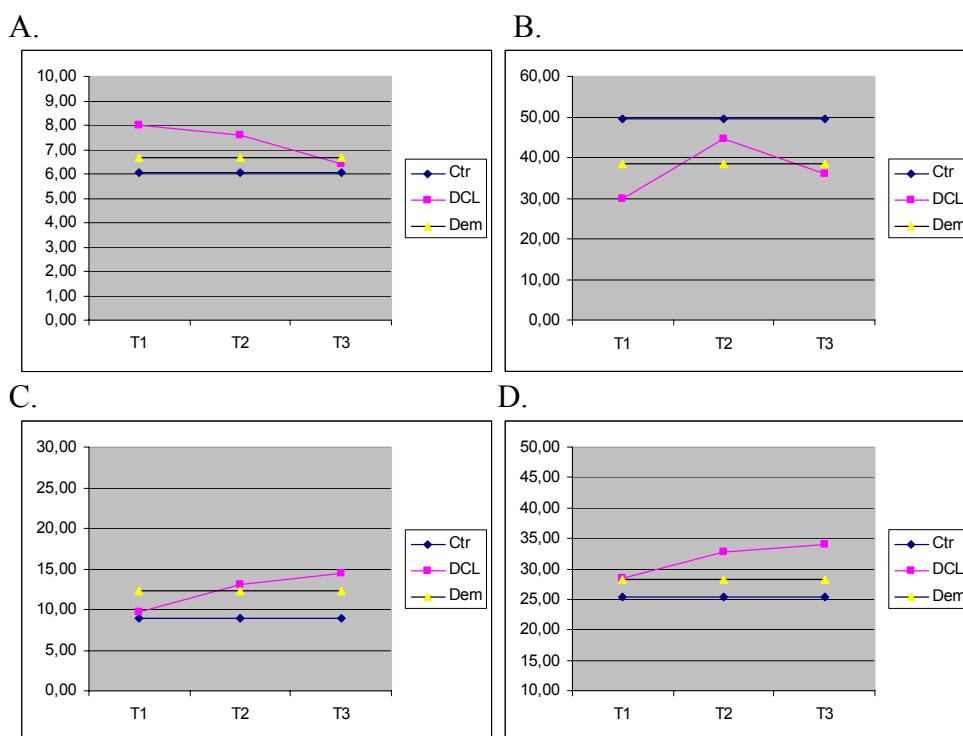


Figura 44. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de linfócitos B que expressam FasL (A, B) e que expressam a proteína Fas (C, D) e à média de intensidades de fluorescência associada a estas proteínas (B, D).

A Figura 45 demonstra que a percentagem de linfócitos T a expressarem FasL sofre um ligeiro aumento ao longo das três avaliações, enquanto a quantidade relativa desta proteína apresenta um aumento inicial acentuado e uma ligeira diminuição entre as segunda e terceira avaliações.

A percentagem de linfócitos T a expressarem Fas apresenta valores mais elevados na segunda avaliação do que na primeira avaliação e valores mais baixos na terceira avaliação. A quantidade média associada desta proteína apresenta níveis continuamente aumentados entre os três tempos de avaliação.

Globalmente, os valores relativos às quantidades de Fas e FasL expressos por este tipo celular apresentam variações mais vincadas ao longo do tempo, quando comparados com os valores relativos às percentagens de linfócitos T.

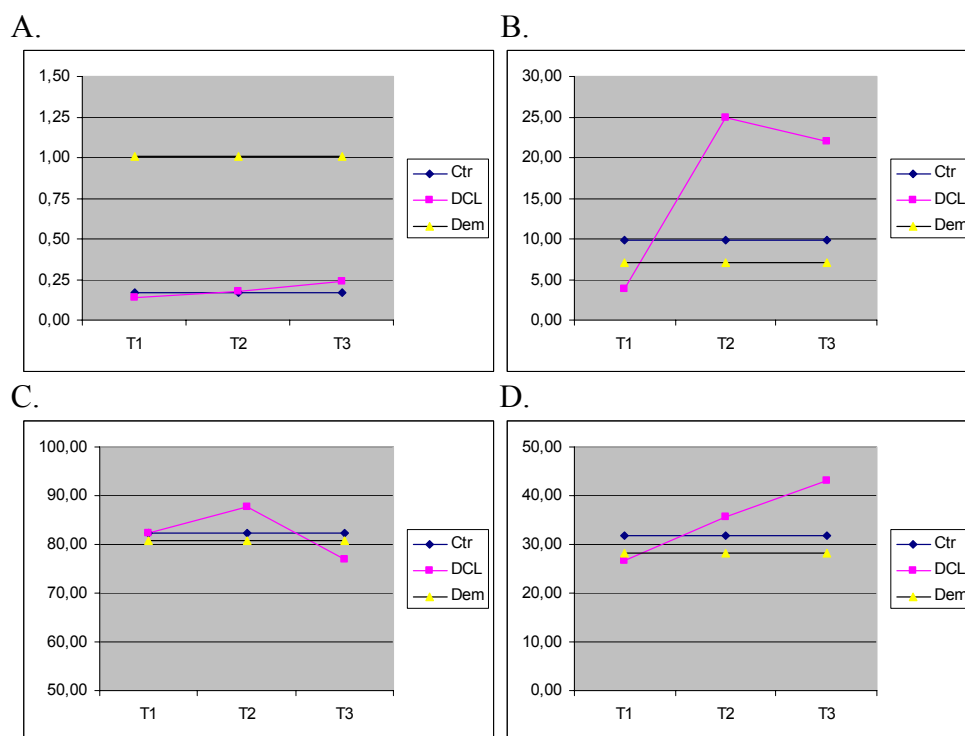


Figura 45. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de linfócitos T que expressam FasL (A, B) e que expressam a proteína Fas (C, D) e à média de intensidades de fluorescência associada a estas proteínas (B, D).

A observação da Figura 46 permite concluir que existe um padrão semelhante para as percentagens de linfócitos NK que expressam Fas e FasL, com um aumento inicial destes valores e uma diminuição na terceira avaliação. As quantidades de ambas as proteínas têm tendência para aumentar ao longo do tempo, mais significativamente no caso do FasL.

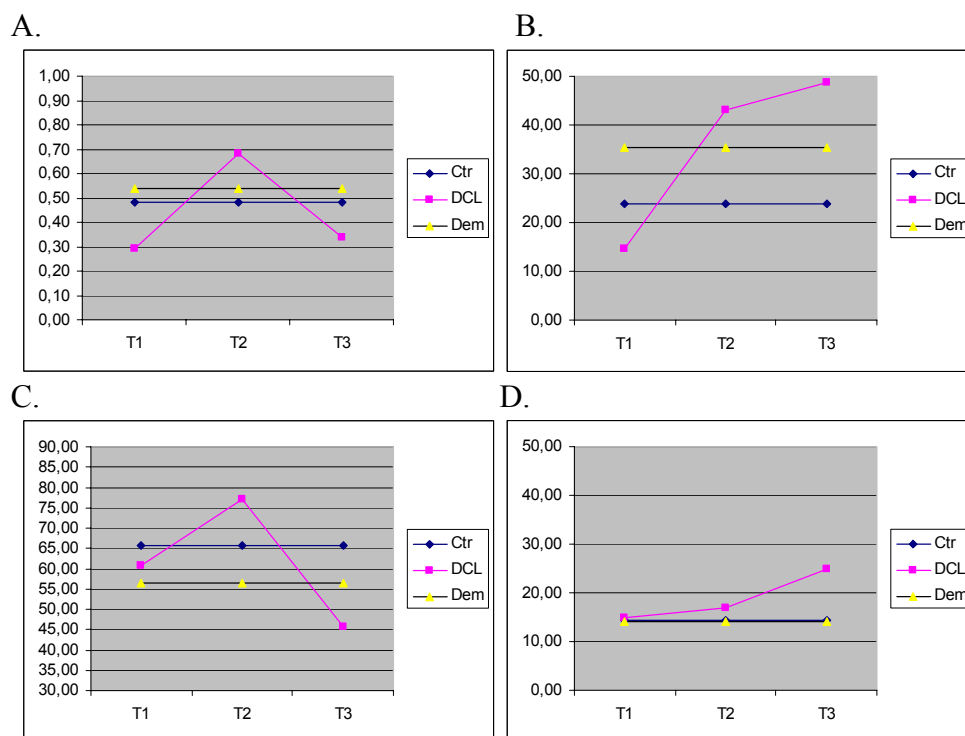


Figura 46. Valores obtidos nas três avaliações do grupo DCL relativos à média da percentagem de linfócitos NK que expressam FasL (A, B) e que expressam a proteína Fas (C, D) e à média de intensidades de fluorescência associada a estas proteínas (B, D).

#### 4. Estudo genético

No que diz respeito ao estudo genético foram realizadas análises de associação entre os diferentes grupos de doentes e o grupo de indivíduos controlo.

##### 4.1. Polimorfismo na posição -857 do gene TNFA (rs1799724)

Foi estudado o polimorfismo na posição -857 do gene TNFA nos grupos de doentes e controlos (Tabela XXIII). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e o grupo controlo. Consideraram-se valores estatisticamente significativos aqueles inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela XXIII- Genotipagem do polimorfismo rs1799724 do gene TNFA nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo				Frequência alélica		
	AA	AG	GG	p	A	G	p
DA	0	46 (0,24)	143 (0,76)	0,1	0,12	0,88	0,3
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	0	27 (0,22)	96 (0,78)	0,4	0,11	0,89	0,5
DA>65	0	26 (0,25)	77 (0,75)	0,4	0,13	0,87	0,3
DA < 65	0	19 (0,29)	47 (0,71)	0,1	0,14	0,86	0,1
DCL	0	11 (0,21)	42 (0,79)	0,7	0,1	0,9	0,7
Ctrl	0	18 (0,18)	80 (0,82)		0,09	0,91	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

#### 4.2. Polimorfismo na posição -308 do gene TNFA (rs1800629)

Foi estudado, no mesmo gene, o polimorfismo na posição -308, nos grupos de doentes e controlos (Tabela XXIV). A nível de genótipos, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo DCL e o grupo controlo ( $p=0,03$ ). Foram ainda encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos de idade e o grupo controlo, a nível da frequência alélica ( $p=0,03$ ). Consideraram-se valores estatisticamente significativos aqueles inferiores a 0,05 ( $p<0,05$ ).

**Tabela XXIV- Genotipagem do polimorfismo rs1800629 do gene TNFA nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	CC	CT	TT		C	T	p
DA	134 (0,76)	37 (0,21)	6 (0,03)	0,2	0,86	0,14	0,16
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	80 (0,72)	26 (0,23)	5 (0,05)	0,5	0,84	0,16	0,6
DA>65	67 (0,74)	19 (0,21)	5 (0,05)	0,3	0,84	0,16	0,5
DA < 65	54 (0,82)	11 (0,17)	1 (0,02)	0,09	0,9	0,1	<b>0,03 *</b>
DCL	44 (0,83)	6 (0,11)	3 (0,06)	<b>0,03 *</b>	0,89	0,11	0,1
Ctrl	65 (0,66)	30 (0,31)	3 (0,03)		0,82	0,18	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo; \*  $p<0,05$ .

### 4.3. Polimorfismo na posição -238 do gene TNFA (rs361525)

Ainda no gene TNFA foi estudado o polimorfismo na posição -238 nos vários grupos em estudo (Tabela XXV). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e o grupo controlo. Consideraram-se valores estatisticamente significativos aqueles inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela XXV- Genotipagem do polimorfismo rs361525 do gene TNFA nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	AA	AG	GG		A	G	p
DA	0	12 (0,08)	130 (0,92)	0,2	0,04	0,96	0,09
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	0	5 (0,07)	71 (0,93)	0,2	0,03	0,97	0,07
DA > 65	0	3 (0,05)	56 (0,95)	0,2	0,03	0,97	0,05
DA < 65	0	7 (0,11)	59 (0,89)	0,5	0,05	0,95	0,4
DCL	0	8 (0,15)	44 (0,85)	0,5	0,08	0,92	1
Ctrl	2 (0,02)	11 (0,12)	82 (0,86)		0,08	0,92	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA > 65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA < 65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

#### 4.4. Polimorfismo na posição -174 do gene IL6 (rs1800795)

Os genótipos e a frequência alélica relativos ao polimorfismo situado na posição -174 do gene IL6 foram determinados nos grupos de doentes e controlos (Tabela XXVI). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e o grupo controlo.

**Tabela XXVI- Genotipagem do polimorfismo rs1800795 do gene IL6 nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	CC	CG	GG		C	G	p
DA	83 (0,45)	84 (0,46)	17 (0,09)	0,2	0,68	0,32	0,2
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	55 (0,47)	54 (0,46)	9 (0,08)	0,1	0,69	0,31	0,1
DA>65	48 (0,48)	44 (0,44)	7 (0,07)	0,1	0,71	0,29	0,09
DA < 65	28 (0,42)	30 (0,45)	8 (0,12)	0,7	0,65	0,35	0,7
DCL	24 (0,46)	24 (0,46)	4 (0,08)	0,3	0,69	0,31	0,3
Ctrl	41 (0,42)	41 (0,42)	16 (0,16)		0,63	0,37	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

#### 4.5. Polimorfismo na posição -572 do gene IL6 (rs1800796)

Neste mesmo gene foi estudado o polimorfismo situado na posição -572 (Tabela XXVII). Mais uma vez não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos, quer a nível de genótipos como a nível de frequências alélicas.

**Tabela XXVII- Genotipagem do polimorfismo rs1800796 do gene IL6 nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	CC	CG	GG		C	G	p
DA	1 (0,01)	24 (0,13)	164 (0,87)	0,9	0,07	0,93	0,9
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	1 (0,01)	18 (0,15)	105 (0,85)	0,9	0,08	0,92	0,7
DA>65	1 (0,01)	16 (0,15)	87 (0,84)	0,8	0,09	0,91	0,6
DA < 65	0	6 (0,09)	59 (0,91)	0,6	0,05	0,95	0,4
DCL	0	5 (0,09)	48 (0,91)	0,7	0,05	0,95	0,4
<b>Ctrl</b>	1 (0,01)	12 (0,12)	85 (0,87)		0,07	0,93	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.



#### 4.6. Polimorfismo na posição +3954 do gene IL1B (rs1143634)

No gene IL1B foi estudado o polimorfismo localizado na posição +3954 (Tabela XXVIII). Não foram encontradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e o grupo controlo. Consideraram-se valores estatisticamente significativos aqueles inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela XXVIII- Genotipagem do polimorfismo rs1143634 do gene IL1B nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	AA	AG	GG		A	G	p
DA	5 (0,03)	70 (0,37)	113 (0,6)	1	0,21	0,79	0,8
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	4 (0,03)	45 (0,37)	73 (0,6)	1	0,22	0,78	0,9
DA > 65	4 (0,04)	40 (0,39)	58 (0,57)	0,9	0,24	0,76	0,7
DA < 65	1 (0,02)	23 (0,36)	40 (0,63)	0,78	0,2	0,8	0,6
DCL	2 (0,04)	16 (0,3)	35 (0,66)	0,62	0,19	0,81	0,5
Ctrl	3 (0,03)	37 (0,38)	57 (0,59)		0,22	0,78	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA > 65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA < 65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

#### 4.7. Polimorfismo na posição -511 do gene IL1B (rs3087258)

Foi também estudado o polimorfismo localizado na posição -511 do promotor do gene IL1B (Tabela XXIX). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e o grupo controlo. No entanto foi encontrada uma associação entre os genótipos deste polimorfismo e a idade de início da doença dos doentes de Alzheimer incluídos no grupo com idade de início superior ou igual a 65 anos e história familiar negativa (Figura 47).

**Tabela XXIX- Genotipagem do polimorfismo rs3087258 do gene IL1B nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	CC	CT	TT		C	T	p
DA	56 (0,39)	65 (0,46)	21 (0,15)	0,4	0,62	0,38	0,2
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	33 (0,43)	33 (0,43)	11 (0,14)	0,6	0,64	0,36	0,5
DA>65	27 (0,47)	24 (0,41)	7 (0,12)	0,7	0,67	0,33	1
DA < 65	23 (0,35)	32 (0,49)	10 (0,15)	0,4	0,6	0,4	0,2
DCL	20 (0,38)	27 (0,51)	6 (0,11)	0,7	0,63	0,37	0,5
Ctrl	43 (0,44)	45 (0,46)	9 (0,09)		0,68	0,32	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

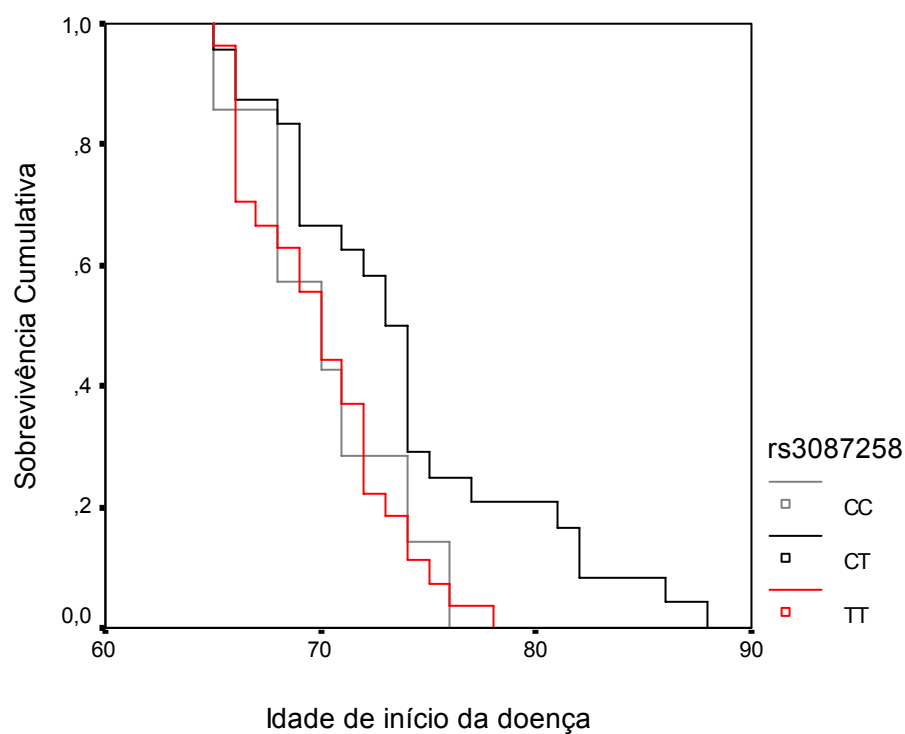


Figura 47. Comparação da sobrevivência cumulativa sem doença entre os três genótipos possíveis para o polimorfismo -511 do gene IL1B no grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença depois dos 65 anos e história familiar negativa..

#### 4.8. Polimorfismo na posição +1188 do gene IL12 (rs3212227)

No gene IL12 foi estudado o polimorfismo localizado na posição +1188, não tendo sido encontradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos de doentes e o grupo dos indivíduos controlos (Tabela XXX).

**Tabela XXX- Genotipagem do polimorfismo rs3212227 do gene IL12 nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo			p	Frequência alélica		
	AA	AC	CC		A	C	p
DA	128 (0,67)	60 (0,31)	4 (0,02)	0,7	0,82	0,18	0,8
DA $\geq$ 65 e história fam. neg.	84 (0,67)	38 (0,3)	4 (0,03)	0,9	0,82	0,18	0,7
DA>65	69 (0,65)	34 (0,32)	3 (0,03)	0,8	0,81	0,19	0,6
DA < 65	44 (0,67)	22 (0,33)	0	0,3	0,83	0,17	0,9
DCL	22 (0,68)	26 (0,27)	5 (0,05)	0,8	0,82	0,18	0,7
Ctrl	67 (0,69)	27 (0,28)	3 (0,03)		0,83	0,17	

DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e história fam. neg. – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo.

#### 4.8. Determinação do genótipo da apolipoproteína E (APOE)

Foi também realizada a genotipagem ApoE. A comparação dos vários grupos de doentes estudados com o grupo controlo revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas em todas as comparações (Tabela XXXI). O grupo DCL ( $p=0,04$ ) apresentou uma diferença menos marcada que os outros grupos ( $p=0,0$ ).

**Tabela XXXI- Genotipagem da APOE nos grupos em estudo**

Grupo	Genótipo						Frequência alélica			p	OR
	$\epsilon_2 \epsilon_2$	$\epsilon_2 \epsilon_3$	$\epsilon_3 \epsilon_3$	$\epsilon_2 \epsilon_4$	$\epsilon_3 \epsilon_4$	$\epsilon_4 \epsilon_4$	$\epsilon_2$	$\epsilon_3$	$\epsilon_4$		
DA	1 (0,01)	13 (0,07)	101 (0,52)	3 (0,02)	56 (0,29)	20 (0,10)	0,05	0,70	0,26	0,0 **	5,9
DA $\geq$ 65 hist. fam-	1 (0,01)	11 (0,09)	61 (0,48)	2 (0,02)	40 (0,31)	13 (0,10)	0,06	0,68	0,27	0,0 **	6,1
DA>65	1 (0,01)	10 (0,09)	51 (0,47)	2 (0,02)	34 (0,31)	10 (0,09)	0,06	0,68	0,26	0,0 **	6,1
DA < 65	0	2 (0,03)	40 (0,61)	1 (0,02)	16 (0,24)	7 (0,11)	0,02	0,74	0,23	0,0 **	4,9
DCL	0	4 (0,08)	37 (0,70)	1 (0,02)	10 (0,19)	1 (0,02)	0,05	0,83	0,12	0,04 *	2,5
Ctrl	1 (0,01)	11 (0,11)	74 (0,77)	0	10 (0,10)	0	0,07	0,88	0,05		

Os resultados são apresentados em valores absolutos e nas frequências correspondentes. DA- Grupo de doentes de Alzheimer; DA  $\geq$  65 e hist. fam- – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos e história familiar da doença negativa; DA>65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença superior a 65 anos; DA<65 – Grupo de doentes de Alzheimer com idade de início da doença inferior a 65 anos; DCL – Grupo de indivíduos com Defeito Cognitivo Ligeiro; Ctrl – Grupo de indivíduos controlo; OR - *Odds ratio* (estes valores referem-se à comparação entre os grupos de doentes com o grupo controlo relativamente à presença ou ausência do alelo  $\epsilon_4$  da ApoE); \*\*  $p<0,005$  e \*  $p<0,05$ .

## **5. Parâmetros de stresse oxidativo**

### **5.1. Níveis de antioxidantes não enzimáticos**

Foram avaliadas as concentrações de ácido úrico, colesterol total, vitamina E, vitamina A, glutatião reduzido e oxidado no plasma e vitamina E, glutatião reduzido e oxidado nos eritrócitos dos indivíduos de cada um dos grupos em estudo (controles, indivíduos com defeito cognitivo ligeiro e doentes de Alzheimer). Foram calculadas, nestes grupos, as razões entre a concentração de glutatião reduzido e oxidado, a nível plasmático e eritrocitário. Foi também analisada a capacidade antioxidante total.

De uma maneira geral o grupo DCL apresenta valores, a nível dos parâmetros de stresse oxidativo referidos, intermédios entre o grupo controlo e o grupo DA.

Os valores médios obtidos para cada um dos grupos foram comparados entre grupos, através de uma análise de variância. Foram registadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), a nível plasmático, nos valores de vitamina E entre o grupo controlo e o grupo DA. Registaram-se também diferenças estatisticamente significativas nos níveis de glutatião oxidado entre o grupo controlo e o grupo DCL e entre o grupo controlo e o grupo DA. A nível eritrocitário estas diferenças estão presentes entre os grupos controlo e DCL e entre os grupos controlo e DA, nos níveis de glutatião reduzido, bem como, na razão entre os níveis de glutatião reduzido e oxidado (Tabela XXXII e Figura 48).

Tabela XXXII- Níveis de antioxidantes não enzimáticos obtidos nos três grupos em estudo.

	Níveis plasmáticos		
	Controlo	DCL	DA
<b>Ácido úrico (mM)</b>	0,26 ± 0,10	0,22 ± 0,10	0,22 ± 0,08
<b>Colesterol total (mM)</b>	5,39 ± 1,05	5,57 ± 0,97	5,25 ± 1,11
<b>GSH (μM)</b>	49,99 ± 99,76	52,18 ± 48,99	64,5 ± 55,75
<b>GSSG (μM)</b>	16,64 ± 6,74	21,80 ± 5,80**	22,71 ± 6,65♦♦
<b>GSH/GSSG</b>	6,09 ± 16,58	2,58 ± 2,97	2,93 ± 2,50
<b>Vitamina A (μM)</b>	1,85 ± 0,40	1,80 ± 0,54	1,78 ± 0,50
<b>Vitamina E (μM)</b>	38,42 ± 13,14	36,32 ± 10,84	29,51 ± 15,95♦
<b>TAS (mM)</b>	0,82 ± 0,23	0,71 ± 0,22	0,72 ± 0,17
<b>Vitamina E/Colesterol</b>	7,06 ± 1,62	6,61 ± 2,08	5,72 ± 2,73
	Níveis eritocitários		
	Controlo	DCL	DA
<b>Vitamina E (nmol/g Hb)</b>	6,73 ± 2,66	7,46 ± 5,42	7,80 ± 2,54
<b>GSH (μmol/g Hb)</b>	4,01 ± 1,74	10,34 ± 11,80**	14,12 ± 13,63♦♦
<b>GSSG (μmol/g Hb)</b>	0,57 ± 0,19	0,55 ± 0,16	0,51 ± 0,15
<b>GSH/GSSG</b>	7,51 ± 3,59	22,71 ± 29,84*	29,93 ± 30,99♦♦

Os resultados são apresentados como média ± desvios-padrão. \* p<0,05 e \*\* p<0,005 quando os grupos DCL e Ctrl são comparados; ♦ p<0,05 e ♦♦ p<0,005 quando os grupos DA e controlo são comparados.

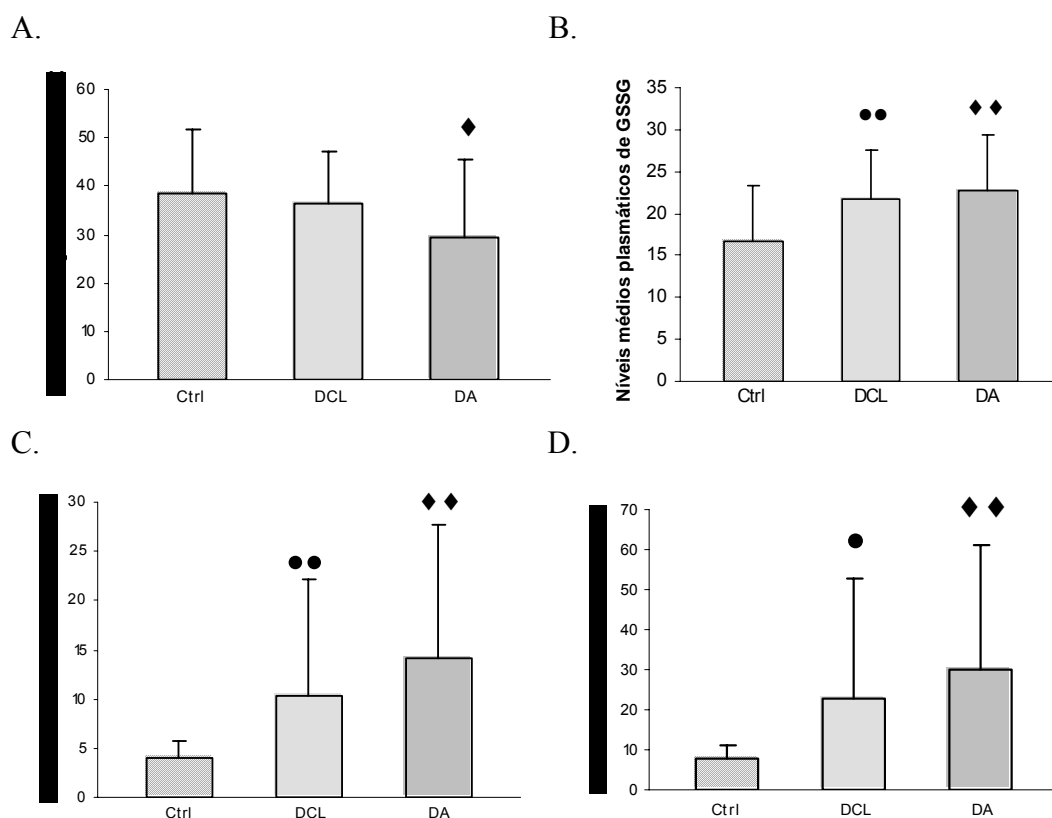


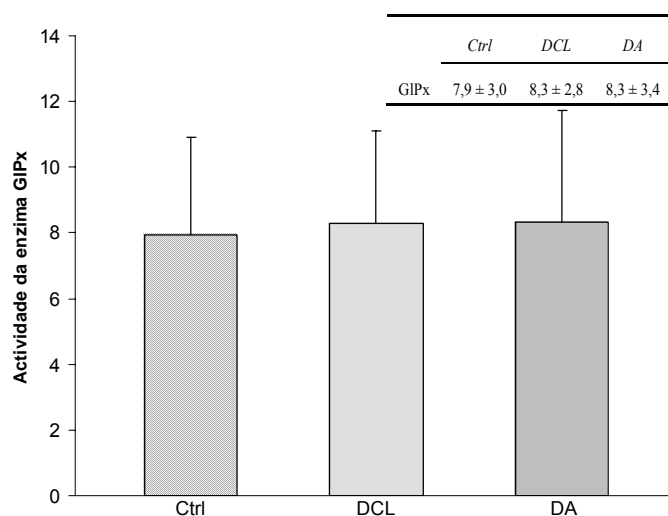
Figura 48. Representação gráfica dos níveis médios plasmáticos de vitamina E (A) e de GSSG (B), dos níveis médios eritrocitários de GSH (C) e da razão entre os níveis eritrocitários de GSH e GSSG (D), nos três grupos em estudo. \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,005$  quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦  $p<0,05$  e ♦♦  $p<0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados; •  $p<0,05$  e ••  $p<0,005$  quando os grupos DCL e controlo são comparados.



## 5.2. Níveis de antioxidantes enzimáticos

Foram avaliadas as actividades, a nível eritrocitário, das enzimas peroxidase do glutatião e redutase do glutatião, envolvidas no metabolismo antioxidante. Foram encontrados valores muito semelhantes entre os três grupos em estudo (Figura 49). Os valores médios obtidos foram comparados entre grupos, não tendo sido encontradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas.

A.



B.

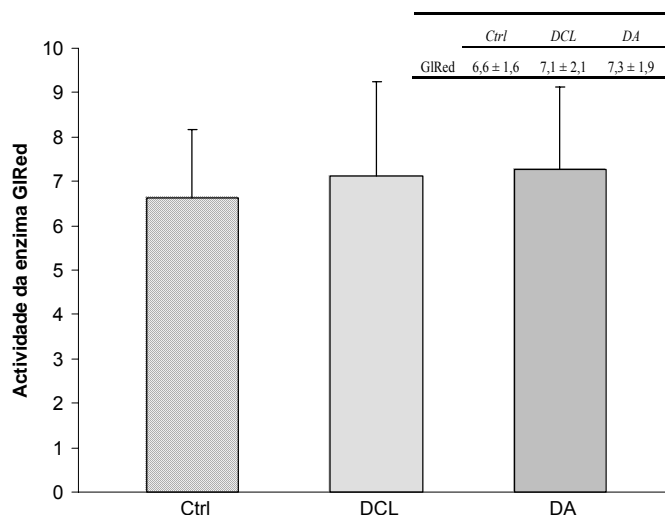


Figura 49. Representação gráfica dos níveis médios de actividade das enzimas GIPx (A) e GRed (B), nos três grupos em estudo. Por cima das barras correspondentes a cada um dos grupos estão apresentados os valores médios ± desvios-padrão.

### 5.3. Níveis de marcadores de oxidação

Foram avaliados os níveis plasmáticos de malonildialdeído, de grupos carbonilo e de metabolitos do óxido nítrico (nitratos e nitritos). Foram ainda determinadas as concentrações de MDA eritrocitário. À exceção dos níveis de MDA eritrocitários, o grupo DCL apresentou níveis intermédios entre os grupos controlo e DA.

Os valores médios obtidos para cada um dos grupos foram comparados entre grupos. Os níveis plasmáticos de NO<sub>2</sub> apresentaram-se significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ) entre o grupo controlo e o grupo DA. Foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de NO<sub>3</sub> entre o grupo controlo e o grupo DCL. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente aos valores de MDA plasmático e eritrocitário, bem como a nível dos grupos carbonilo (Tabela XXXIII e Figuras 50 e 51).

**Tabela XXXIII- Níveis de marcadores de oxidação obtidos para os três grupos em estudo.**

	Níveis plasmáticos		
	Controlo	DCL	DA
<b>MDA (μM)</b>	1,54 ± 0,56	1,51 ± 0,70	1,28 ± 0,56
<b>Grupos carbonilo (μM)</b>	241,52 ± 130,25	238,00 ± 89,42	215,25 ± 79,46
<b>NO<sub>2</sub> (μM)</b>	0,80 ± 0,63	0,66 ± 0,65	0,43 ± 0,31**
<b>NO<sub>3</sub> (μM)</b>	1,95 ± 1,50	3,64 ± 2,11*	3,28 ± 2,42
	Níveis eritrocitários		
	Controlo	DCL	DA
<b>MDA (nmol/g Hb)</b>	21,50 ± 23,62	21,56 ± 15,91	18,01 ± 8,78

Os resultados são apresentados como média ± desvios-padrão. \*  $p < 0,05$  quando os grupos DCL e controlo são comparados; \*\*  $p < 0,005$  quando os grupos DA e controlo são comparados.

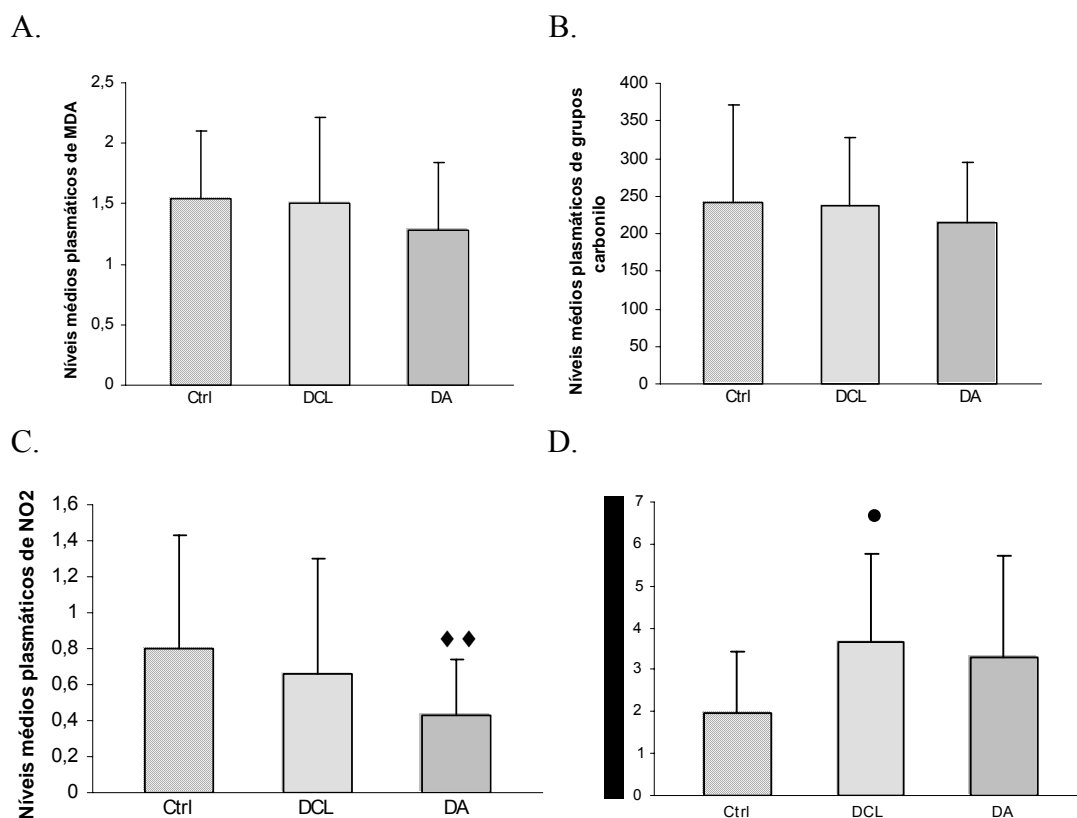


Figura 50. Representação gráfica dos níveis médios plasmáticos de MDA (A), grupos carbonilo (B), NO<sub>2</sub> (C) e NO<sub>3</sub> (D), nos três grupos em estudo. \* p<0,05 e \*\* p<0,005 quando os grupos DCL e DA são comparados; ♦ p<0,05 e ♦♦ p<0,005 quando os grupos DA e controlo são comparados; • p<0,05 e •• p<0,005 quando os grupos DCL e controlo são comparados.

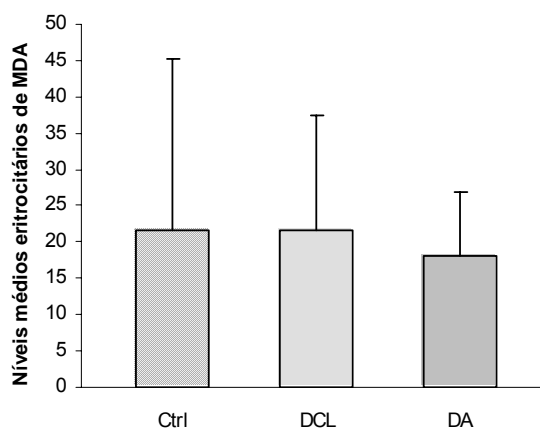


Figura 51. Representação gráfica dos níveis médios eritrocitários de MDA, nos três grupos em estudo.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho propusemo-nos estudar um grupo de doentes de Alzheimer em estadio ligeiro, um grupo de indivíduos com DCL e um grupo de indivíduos controlo com o objectivo primário de analisar as alterações nos parâmetros de stresse oxidativo, inflamatórios e nos níveis de expressão de proteínas envolvidas em mecanismos de morte celular por apoptose, encontradas entre os três grupos.

Pretendeu-se também identificar marcadores biológicos e genéticos e preditores de prognóstico, ou seja, de conversão do estadio de DCL para DA. Para alcançar este objectivo foi necessária uma abordagem longitudinal, com avaliações intermédias dos indivíduos com DCL.

O diagnóstico da doença de Alzheimer é feito com base em exames clínicos e neuropsicológicos, enquanto o diagnóstico diferencial de outros tipos de demência é baseado em critérios de exclusão. Não existe, hoje em dia, um teste laboratorial capaz de discriminar os doentes com demência de indivíduos saudáveis. Um marcador biológico bem caracterizado que preencha os requisitos para o diagnóstico da DA teria várias vantagens [342]. O diagnóstico definitivo da DA apenas pode ser feito através do exame anato-mo-patológico, *postmortem*, do tecido cerebral, com a pesquisa da presença de placas senis e de tranças neurofibrilares. No entanto, a mera presença destas características neuropatológicas da DA no tecido cerebral não é uma evidência suficiente para um diagnóstico conclusivo, isto porque já foi descrita a presença destas mesmas características em cérebros de indivíduos idosos, cognitivamente saudáveis [343, 344].

Um marcador biológico ideal deveria identificar casos de DA num estadio muito precoce da doença, antes dos sintomas cognitivos se apresentarem nos testes neuropsicológicos e antes da ocorrência de degeneração no cérebro, que possa ser mostrada por estudos imagiológicos. Um biomarcador que reflecta as alterações neuropatológicas a nível molecular no cérebro de doentes de Alzheimer seria muito útil no diagnóstico diferencial de demência e na distinção de doentes de Alzheimer de indivíduos com defeito cognitivo ligeiro que virão a desenvolver DA e de doentes com depressão. Um biomarcador poderia ser a primeira evidência para o início de uma terapêutica tão cedo quanto possível e extremamente valioso na monitorização da eficácia deste mesmo tratamento, especialmente se este for direccionado para parar ou prevenir o desenvolvimento de alterações neuropatológicas. Um marcador biológico seria também útil

no seguimento da progressão da doença ou na avaliação da população em risco para a doença. Durante anos tem-se procurado um marcador bioquímico *antemortem*. Por exemplo, têm sido realizados testes laboratoriais no plasma, líquido cefalorraquidiano (LCR), eritrócitos, linfócitos, urina, cabelo e pele [345-350]. Bioquimicamente, no LCR e no sangue têm sido obtidos níveis mais elevados de sensibilidade e especificidade, principalmente a nível do LCR. No entanto, a análise deste líquido biológico implica uma colheita dolorosa, com algum risco para os doentes e que acarreta, por vezes, complicações metodológicas. Assim, a tentativa de encontrar um biomarcador no sangue periférico torna-se, cada vez mais, imperativa.

### ***Considerações às metodologias utilizadas***

Foi feita uma primeira avaliação dos indivíduos participantes neste estudo, após todo o processamento de critérios de inclusão que nos casos dos indivíduos diagnosticados com DA ou DCL incluíram uma entrevista e observação pelo neurologista, um estudo neuropsicológico (MMSE), a definição do estadiamento global de demência (CDR), o estudo de imagem (TAC ou RM craneoencefálica) e o estudo laboratorial de rotina para exclusão de outras causas para a deterioração cognitiva.

Foram considerados controlos para este estudo, os indivíduos sem doença neurológica, com parâmetros bioquímicos conhecidos e em base de dados do Laboratório de Neuroquímica dos HUC e com idades semelhantes às dos indivíduos que constituem os dois grupos em estudo.

Laboratorialmente esta primeira avaliação centrou-se na análise da produção e expressão de citocinas inflamatórias e proteínas de morte celular por células do sangue periférico e no estudo de parâmetros de stresse oxidativo que incluíram os níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, bem como os níveis de marcadores de oxidação. Foi ainda realizada a análise de alguns polimorfismos dos genes das citocinas estudadas a nível da produção e expressão pelas células do sangue periférico. Estes dados permitiram realizar um estudo comparativo entre doentes e indivíduos controlo.

As segunda e terceira avaliações foram realizadas 6 e 12 meses após a primeira, tendo apenas sido avaliados os indivíduos com DCL. Laboratorial e clinicamente foram analisados os mesmos parâmetros inflamatórios e de expressão de proteínas envolvidas em

processos apoptóticos analisados na primeira avaliação, com uma especial atenção nas escalas neuropsicológicas com o objectivo de determinar a conversão, ou não, de DCL para DA.

O estudo transversal de comparação dos vários parâmetros entre os três grupos em estudo realizou-se com a participação de 25 controlos, 45 indivíduos com DCL e 35 doentes de Alzheimer. Ao longo do estudo longitudinal alguns doentes decidiram não continuar a participar nesta investigação e outros não compareceram na consulta correspondente aos segundo e terceiro tempos de avaliação. Assim, a segunda avaliação contou com 24 indivíduos e a terceira avaliação com 30. Este factor dificultou a análise estatística longitudinal dos resultados obtidos tendo, por isso, sido feita apenas uma análise gráfica dos parâmetros analisados ao longo do tempo. Dos 45 indivíduos com DCL, ao fim dos 12 meses de estudo, foi considerado que 7 cumpriam os critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer provável, representando 15,6% do número total de indivíduos incluídos neste grupo. Destes 7 doentes que demenciaram, um faleceu após ter sido feito o diagnóstico da doença e ainda durante o estudo. Esta percentagem está de acordo com estudos anteriormente descritos. Petersen *et al*, em 2001, apresentam uma revisão da literatura nesta área, referindo que consoante os critérios de diagnóstico e de inclusão adoptados nos diferentes estudos, foram obtidas taxas anuais de progressão de DCL para demência entre os 6 e os 25% [67].

Como foi extensamente exposto na secção materiais e métodos, a citometria de fluxo apresenta enormes vantagens na determinação de citocinas intracelulares. Principalmente porque as citocinas em circulação têm uma vida média relativamente curta e porque podem atingir concentrações elevadas nos diferentes locais de secreção e concentrações muito mais baixas após diluição no sangue. Podem ainda circular ligadas a outras moléculas, o que pode impedir a sua detecção através de métodos imunológicos convencionais. Todos estes aspectos contribuem de certa forma para a grande variabilidade encontrada na literatura disponível. Assim, a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo permitiu-nos determinar a percentagem média de células a produzir e expressar determinada citocina. Por outro lado, através das médias de intensidades de fluorescência foi possível obter uma ideia das quantidades relativas de cada citocina. Esta técnica não permite dosear de forma absoluta as citocinas produzidas, mas permite dizer que determinada população celular está a produzir maior ou menor quantidade de citocinas

quando comparada com outra população celular. Assim sendo, teria sido interessante determinar as concentrações das citocinas no plasma dos indivíduos constituintes dos três grupos em estudo. No entanto, esta determinação apresenta grandes problemas, devido às pequenas quantidades destas citocinas presentes no soro/plasma e ao baixo nível de sensibilidade dos métodos ELISA passíveis de serem usados. Por exemplo num estudo, a IL-6 plasmática foi detectada apenas em 53% dos doentes de Alzheimer e em 27% dos controlos, enquanto a IL-1 $\beta$  foi detectada em apenas 13% dos doentes (n=145) e 2% dos controlos (n=51) [351]. De forma semelhante, noutro estudo a concentração de IL-6 na maioria das amostras encontrava-se abaixo do limite de detecção do sistema usado (0,7 pg/ml) [352]. Pirttla *et al* apresentaram um outro estudo em que a maior parte das amostras apresentaram níveis de IL-1 $\beta$  abaixo do limite de detecção da técnica ELISA utilizada (10 pg/ml) [353].

Teria, naturalmente, sido desejável o estudo de uma amostra maior. No entanto, os imperativos de tempo para a realização deste trabalho, apesar de terem permitido alcançar os objectivos propostos, impediram a realização de um estudo com um número maior de indivíduos. Outro aspecto importante a ter em conta é o facto deste estudo incidir sobre pessoas, o que acarreta logo à partida uma grande variabilidade interindividual, apesar de terem sido cumpridos todos os critérios de inclusão/exclusão. Pode assim explicar-se a existência de alguns valores elevados de variância estatística.

Geneticamente existem dois tipos principais de estudos que podem ser aplicados na análise de patologias. São eles a descoberta de novas mutações causadoras dessas mesmas patologias e os estudos de associação genética. Estes estudos de casos-controlos têm vindo a ser cada vez mais utilizados na última década, para testar a associação entre variantes na sequência genética e doenças complexas [354].

A premissa destes estudos baseia-se no facto do aumento da frequência de um determinado alelo ou genótipo nos doentes quando comparados com os controlos implicar variantes na sequência génica que, ou aumentam o risco para determinada doença, ou estão em forte *linkage disequilibrium* (LD) com a mutação causal da doença. No entanto, outros factores podem conduzir à observação de diferenças nas frequências alélicas ou genótípicas entre casos e controlos. Estes factores incluem, entre outros, a exposição a factores ambientais, estratificação da população, erros de genotipagem, etc. [355]. As

diferenças na distribuição por sexo e idade da população podem também complicar a análise de associação entre casos e controlos, principalmente porque a probabilidade de desenvolver doença de Alzheimer aumenta com a idade e parece haver uma maior incidência desta doença em indivíduos do sexo feminino particularmente após a menopausa [356]. No presente trabalho não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias das idades nos três grupos estudados. Relativamente à distribuição por sexos, esta não foi semelhante entre os diferentes grupos. Este facto poderá trazer alguns problemas nas comparações efectuadas entre grupos.

Para além dos factores genéticos existem naturalmente outros agentes de risco para o desenvolvimento da doença, no entanto, os vários trabalhos que tentaram determinar os seus efeitos na etiologia da doença, não foram suficientemente consistentes. Entre estes factores, o tabaco, os traumatismos cranianos, os baixos níveis de escolaridade, depressões prévias e factores vasculares parecem ser aqueles que reúnem maior consenso [357-359]. Não caiu no âmbito do presente trabalho fazer um estudo destes factores eventualmente relacionados com a doença de Alzheimer, podendo, por isso, haver um enviesamento de alguns resultados eventualmente influenciados por este tipo de factores.

Relativamente às estratégias de *linkage* (localização aproximada de genes), este tipo de estudos apresenta vantagens óbvias como o maior poder estatístico e a maior quantidade de conhecimento adquirida relativamente ao local onde se localiza o gene. Por outro, lado apresenta como principais desvantagens o facto de o gene que possui uma razão teórica para estar associado à doença, necessariamente já ter de ter sido identificado, a existência de falsos positivos devidos à grande quantidade de *loci* identificados e, por último, a estratificação da população [360].

A doença de Alzheimer esporádica tem sido extensivamente estudada, na procura de uma causa genética. Para além da bem estabelecida relação entre o genótipo E4 da ApoE, os outros genes candidatos apresentam associações mais fracas com a DA e o seu papel continua controverso. Na realidade os estudos caso-controlo são frequentemente contraditórios [361].

Este tipo de estudos tem necessariamente de envolver um grande número de indivíduos para poder ser válido. Assim, foi determinada uma população diferente daquela estudada relativamente aos parâmetros inflamatórios, de morte celular e de stresse oxidativo. Foi estudada uma população com 197 doentes de Alzheimer, 55 indivíduos com



DCL e 98 controlos. Estes números resultaram da selecção consecutiva de doentes por parte da equipa médica durante o tempo disponível para a realização do estudo. Os controlos foram seleccionados de duas formas diferentes. A grande maioria são indivíduos também avaliados pela equipa médica de maneira a excluir qualquer perturbação neurológica e que constavam na base de dados do Laboratório de Neuroquímica dos HUC. Os restantes foram recrutados entre os familiares ou amigos dos doentes que se deslocavam às consultas a acompanhá-los, após terem sido submetidos a uma avaliação por parte da equipa médica.

Foram feitas subdivisões do grupo inicial tendo sido determinados grupos de doentes com forma esporádica da doença de Alzheimer e de doentes com forma esporádica e com idade de início da doença superior ou igual a 65 anos de idade. Este último grupo, embora tenha um número de indivíduos inferior ao desejável, pretende simular um grupo de doentes de Alzheimer esporádicos, com a idade de início mais frequente e características mais comuns. Devido à elevada prevalência da doença de Alzheimer, considerou-se que os doentes apresentavam uma história familiar positiva desta doença apenas nos casos da existência de familiares em primeiro grau afectados.

Neste trabalho foram realizados estudos genéticos de associação (casos *vs* controlos) na população em estudo o que permitiu comparar as frequências de determinados alelos e/ou genótipos entre os vários grupos, tendo sido analisados alguns polimorfismos dos genes das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , bem como o genótipo da ApoE.

## ***Parâmetros inflamatórios***

### **Monócitos**

A Tabela IX apresenta os resultados médios relativos à percentagem de monócitos que expressam e produzem as citocinas em estudo para cada um dos grupos. Para além desta informação, através das médias de intensidade de fluorescência podemos ter uma ideia relativa das quantidades de cada uma destas citocinas.

Através da observação destes resultados relativos à produção e expressão das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$  por monócitos no sangue periférico pode concluir-se que existe um aumento gradual no valor médio destas células do grupo controlo para o

grupo DA, estando o grupo DCL claramente situado entre estes dois outros grupos. Este aumento é mais evidente nos resultados obtidos nos ensaios que envolvem células não estimuladas, quando comparados com os ensaios efectuados após estimulação dos monócitos com LPS 100 ng/ml.

Outros estudos descreveram que os valores aumentados de citocinas se correlacionam de forma positiva com as idades dos indivíduos [362]. Neste trabalho esta influência foi ultrapassada, uma vez que os três grupos em estudo apresentam idades semelhantes, pelo que, as diferenças encontradas entre grupos, não podem ser atribuídas à influência do factor idade.

Os níveis de citocinas produzidos (MIF) não apresentaram um padrão semelhante entre as diferentes interleucinas, como aconteceu para as percentagens médias de monócitos. Assim, relativamente ao TNF- $\alpha$ , esta média diminui nos ensaios realizados após activação celular, entre o grupo controlo e o grupo DA, mais uma vez com o grupo DCL com valores intermédios. Nos ensaios em células não activadas há um aumento dos níveis desta citocina entre os grupos controlo e DCL e uma ligeira diminuição entre este último e o grupo DA, ou seja, a nível fisiológico, no grupo DA há uma grande percentagem de células a produzir TNF- $\alpha$ , no entanto, as quantidades relativas desta citocina, embora aumentadas quando comparadas com o grupo controlo, estão diminuídas quando comparadas com o grupo DCL.

Os níveis de IL-6 produzidos nos ensaios em células não activadas e nos ensaios após activação aumentam quando comparamos os grupos controlo, DCL e DA, o que sugere não só um aumento da percentagem de monócitos a produzir IL-6, mas também um aumento nos níveis relativos desta citocina.

O mesmo acontece para a IL-12 nos ensaios em células não activadas, no entanto, nos ensaios após estimulação celular há uma ligeira diminuição entre o grupo controlo e o grupo DCL e um aumento entre os grupos DCL e DA, sendo os valores médios obtidos para este último grupo mais elevados do que para os anteriores.

Nos ensaios em células não activadas, os níveis de IL-1 $\beta$  aumentam entre os grupos controlo, DCL e DA, embora muito ligeiramente. Pelo contrário os ensaios após activação das células mostram uma clara diminuição nos níveis desta citocina entre estes grupos, à semelhança do que acontece com o TNF- $\alpha$ .

Através da subtracção das médias obtidas para os ensaios em células não activadas às

médias obtidas para os ensaios após activação, podemos avaliar a capacidade de resposta destas células a um estímulo inflamatório (LPS). Assim, por observação da Tabela X, pode concluir-se que a capacidade de produção da citocina TNF- $\alpha$ , após sujeição dos monócitos a este estímulo, é menor nos indivíduos com doença de Alzheimer quando comparada com os outros dois grupos. Mais uma vez observa-se que o grupo DCL apresenta valores intermédios entre o grupo controlo e o grupo DA. Esta diminuição na capacidade de resposta acontece para os dois parâmetros estudados, ou seja, percentagem de células e intensidades de fluorescência, no entanto, relativamente à percentagem de células esta diminuição é maior entre o grupo DCL e o grupo DA, enquanto se observa uma diminuição muito mais drástica a nível da quantidade de citocinas produzidas entre os grupos controlo e DCL.

Quando relacionados estes resultados com as quantidades de citocinas e percentagens de células atrás referidas, pode concluir-se que os controlos possuem uma maior capacidade de resposta a um estímulo com produção de grandes quantidades desta citocina, encontrando-se os grupos DCL e DA muito semelhantes entre si relativamente a este parâmetro. Por outro lado, os doentes de Alzheimer, apesar de terem uma capacidade de resposta muito diminuída, esta resposta acontece principalmente devido ao aumento do número de células produtoras de TNF- $\alpha$ . De recordar apenas que este grupo é aquele que apresenta menor quantidade de citocinas produzidas após estimulação, mas por outro lado apresenta a maior percentagem de monócitos a produzir TNF- $\alpha$  (Figura 14).

Esta situação de diminuição da capacidade de resposta entre os grupos controlo e DA, com os valores do grupo DCL a situarem-se numa posição intermédia verifica-se também nos resultados relativos à percentagem de células produtoras de IL-6 e naqueles relativos às médias de intensidade de fluorescência da interleucina-1 $\beta$ . A capacidade de resposta a nível da produção de IL-6 é maior no grupo DCL e menor no grupo controlo.

O padrão de capacidade de resposta relativo à IL-12 mostra uma maior percentagem de células produtoras desta interleucina no grupo DCL e uma percentagem muito menor no grupo DA. Esta resposta, relativamente à quantidade de IL-12 produzida, apresenta-se semelhante para os grupos DCL e DA e muito superior no grupo controlo. Este mesmo padrão aplica-se à percentagem de monócitos produtores de IL-1 $\beta$ .

Estes resultados sugerem que, principalmente no que concerne à citocina TNF- $\alpha$ , nos doentes de Alzheimer, a nível fisiológico, existe uma maior quantidade de células a

expressarem e produzirem citocinas pró-inflamatórias quando comparados com os indivíduos constituintes dos outros dois grupos. No entanto, quando os monócitos são solicitados a produzirem uma resposta a um estímulo inflamatório esta resposta não é tão eficaz como nos outros dois grupos, provavelmente devido à produção continuamente aumentada de citocinas na doença de Alzheimer.

Não foi encontrada qualquer correlação entre as idades dos indivíduos constituintes do grupo controlo e os resultados dos parâmetros estudados em monócitos. Relativamente ao grupo DCL observaram-se correlações negativas significativas ( $p < 0,01$ ) entre os valores médios das percentagens de monócitos não activados, produtores de TNF- $\alpha$  e a idade e a idade de início da doença.

Comparativamente, o grupo DA apresenta vários parâmetros correlacionados com a idade, idade de início da demência e valores de MMSE.

A percentagem média de monócitos neste grupo correlaciona-se de forma positiva e significativa com os valores obtidos com a escala MMSE ( $p < 0,05$ ).

A idade correlaciona-se de forma positiva e significativa com os seguintes parâmetros: percentagem de monócitos activados produtores de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), percentagem de monócitos activados e não activados produtores de IL-6 ( $p < 0,05$  e  $< 0,01$  respectivamente), percentagem de monócitos activados produtores de IL-12 ( $p < 0,05$ ) e quantidade desta citocina produzida por monócitos não activados e activados ( $p < 0,05$  e  $< 0,01$  respectivamente).

A idade de início da doença correlaciona-se também de forma positiva e significativa com os seguintes parâmetros: percentagem de monócitos não activados e activados produtores de IL-6 ( $p < 0,05$  e  $< 0,01$  respectivamente), quantidade de IL-6 produzida por monócitos não activados ( $p < 0,05$ ), percentagem de monócitos não activados e activados produtores de IL-12 ( $p < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente), quantidade de IL-12 produzida por monócitos activados ( $p < 0,01$ ) e quantidade de IL-1 $\beta$  produzida por monócitos não activados ( $p < 0,05$ ).

Não parece haver um padrão de correlação definido entre os vários parâmetros analisados, no entanto pode concluir-se que estas correlações acontecem essencialmente a nível do grupo DA. Esta evidência sugere que a idade, para além de ser o principal factor de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, depois desta estar instalada, parece estar altamente correlacionada com os parâmetros inflamatórios estudados a nível

de monócitos.

Ao contrário do que tinha sido previamente descrito relativamente à produção diminuída de IL-6 e TNF- $\alpha$  por células monocitárias em mulheres idosas quando em comparação com indivíduos do sexo masculino com idades semelhantes, os nossos resultados apresentam um aumento significativo nas médias das percentagens de monócitos com e sem estimulação produtores de IL-6 ( $p=0,03$  e  $p=0,02$ ) e de monócitos estimulados produtores de IL-12 ( $p=0,01$ ), nos indivíduos do sexo feminino quando comparados com indivíduos do sexo masculino, no grupo DCL [363]. No grupo controlo a quantidade média de TNF- $\alpha$  produzida após activação encontrava-se também significativamente aumentada ( $p=0,04$ ) no grupo de indivíduos do sexo feminino. Provavelmente estas alterações não serão consequência da doença em si, mas sim de diferenças a nível hormonal, no entanto noutras patologias de cariz neuroinflamatório, como é o caso da esclerose múltipla, foram também encontradas diferenças entre sexos relativamente aos níveis de citocinas periféricos [364]. Há também que ter em conta a diferente distribuição de sexos nos três grupos em estudo.

De Luigi *et al* descreveram um aumento significativo na concentração de IL-1 $\beta$  em circulação em doentes de Alzheimer com doença moderada (MMSE=10-19) quando em comparação com controlos de idades semelhantes. Para além disto, a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelas células sanguíneas foi medida após incubação destas com LPS [365]. Foi concluído que esta secreção se apresentava diminuída nos doentes de Alzheimer quando em comparação com o grupo controlo, inferindo que os níveis aumentados de citocinas no plasma não poderiam ser resultado de uma resposta aumentada destas células. O nosso estudo mostra que não se pode chegar a esta conclusão de forma tão linear, uma vez que os monócitos periféricos a nível fisiológico expressam e secretam uma maior quantidade de citocinas no grupo DA quando em comparação com os grupos DCL e controlo. Também encontrámos uma resposta diminuída após estimulação das células, no grupo DA, mas este facto só significa que a capacidade de resposta destas células está comprometida e não que estas células são incapazes de serem responsáveis, a nível fisiológico, pelas quantidades aumentadas de citocinas presentes no sangue de indivíduos com DCL e doentes de Alzheimer. O mesmo estudo encontrou apenas diferenças entre os grupos controlo e DA moderado sugerindo que estas alterações a nível de citocinas ocorrem apenas em fases mais avançadas da doença. Os nossos resultados também contradizem esta suposição, uma

vez que foram encontradas algumas diferenças significativas entre os grupos DCL e controlo, o que indica alterações numa fase anterior ao desenvolvimento de demência. Para além deste factor, os doentes de Alzheimer por nós estudados encontravam-se também numa fase inicial da doença.

Sala *et al* não encontraram níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  significativamente diferentes entre controlos e doentes de Alzheimer, em condições basais. No entanto, após estimulação das células sanguíneas, observou-se uma diminuição na capacidade destas células produzirem citocinas no grupo DA, quando em comparação com controlos [366]. Relativamente a esta última análise o nosso estudo apresentou conclusões semelhantes. No que diz respeito aos níveis basais destas citocinas em circulação, provavelmente as discrepâncias resultam das diferentes metodologias utilizadas. Aqueles autores encontraram ainda uma correlação negativa e significativa entre os níveis de citocinas secretados e o grau de severidade da doença determinado com a escala MMSE. Os nossos resultados não apresentam qualquer correlação com o grau de severidade da doença, provavelmente por estarmos a trabalhar com um grupo de doentes de Alzheimer em estadio ligeiro, enquanto no estudo de Sala *et al* foram estudados indivíduos com doença de Alzheimer ligeira, moderada e severa.

Na análise gráfica do estudo longitudinal dos indivíduos com DCL, de uma maneira geral, todas as citocinas apresentam um padrão de evolução semelhante.

Ao longo do tempo, nas condições basais, o perfil de citocinas do grupo DCL torna-se mais semelhante ao perfil apresentado pelos controlos, no entanto, quando as células são “desafiadas” com um estímulo inflamatório (ensaio com activação) este perfil apresenta uma tendência para se tornar semelhante àquele apresentado pelo grupo DA. Esta evidência poderá também sugerir que, ao longo do tempo, no grupo DCL poderá ocorrer a perda da capacidade das células responderem aos insultos a que estão sujeitas.

## **Linfócitos**

A determinação dos vários subtipos linfocitários, bem como a determinação da produção e expressão de TNF- $\alpha$  por estas mesmas células não apresentou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos em estudo.

Não foram utilizados ensaios controlo (sem estimulação) devido ao facto de ter sido descrito anteriormente que estas células não apresentam positividade para citocinas se não

forem estimuladas [328]. Assim, foi apenas feita a determinação destes parâmetros em linfócitos após a activação com PMA e ionomicina durante um período de 4 horas. Os primeiros ensaios realizados mostraram que os valores obtidos para a interleucina 6 eram muito discrepantes intra e interindividualmente, pelo que, se optou por fazer apenas as determinações relativas ao TNF- $\alpha$ .

Os padrões dos vários subtipos linfocitários, observados entre os diferentes grupos em estudo, não apresentaram semelhanças. O padrão observado para a totalidade dos linfócitos, ou seja, valores muito semelhantes para os grupos controlo e DA e valores relativamente mais baixos para o grupo DCL, advém provavelmente dos resultados obtidos para os linfócitos CD3+/CD8-, uma vez que estes representam a grande maioria da população linfocitária.

Relativamente às células produtoras de TNF- $\alpha$ , mais uma vez não se encontra um padrão definido para a produção desta citocina (MIF), mas para todos os subtipos linfocitários há uma maior produção e expressão de TNF- $\alpha$  no grupo DCL, quando em comparação com os outros dois grupos.

A análise gráfica longitudinal do grupo DCL mostra que à excepção dos linfócitos CD3-/CD8-, a percentagem de todos os outros diminui (valores mais baixos na segunda do que na primeira avaliação), para depois voltarem a aumentar (valores mais elevados na terceira do que na segunda avaliação). Curiosamente, a percentagem dos vários subtipos linfocitários a produzir TNF- $\alpha$ , bem como a quantidade desta citocina produzida, tende a diminuir progressivamente ao longo do tempo. Estes valores sugerem que ao longo do tempo, os indivíduos com DCL apresentam uma diminuição inicial do número de linfócitos e uma posterior resposta com aumento destes números. No entanto, esta resposta não ocorre relativamente à capacidade de produção de TNF- $\alpha$ , tanto a nível da percentagem de células a produzir esta citocina, como também nos níveis relativos de citocina produzidos.

No grupo DA não há qualquer correlação significativa entre a idade, a idade de início da doença e os valores determinados em linfócitos. De forma semelhante não há qualquer correlação significativa entre as idades dos indivíduos constituintes do grupo controlo e estes mesmos parâmetros. No que concerne ao grupo DCL, observam-se correlações significativas ( $p < 0,01$ ) entre a percentagem de linfócitos CD3+/CD8- e a idade dos doentes, bem como entre este mesmo tipo linfocitário e a idade de início da doença.

Observam-se também correlações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a percentagem de linfócitos CD3+/CD8- produtores de TNF- $\alpha$  e as idades e idades de início destes indivíduos. O mesmo tipo de correlação é verificado entre os linfócitos CD3+/CD8+ e as idades de início da doença neste grupo. Todas estas correlações são de natureza negativa. Estes resultados estão de alguma forma de acordo com aqueles descritos por McNerlan *et al* num estudo em que foi feita a determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  expressos por células T CD3+ em indivíduos idosos e comparados com os valores apresentados por indivíduos jovens. Foi encontrado um aumento significativo da expressão desta citocina no grupo de indivíduos idosos, o que sugere que a idade terá uma correlação, neste caso positiva, com os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos por este tipo celular [328].

Nenhum dos grupos de doentes apresenta qualquer correlação entre os resultados relativos aos linfócitos e os valores obtidos com o instrumento de avaliação cognitiva MMSE.

De uma forma geral podemos concluir que há uma correlação negativa entre a idade e os valores relativos aos linfócitos, contrariamente ao que acontece com os parâmetros estudados em monócitos que apresentam, globalmente, uma correlação positiva.

Lombardi *et al* não encontraram diferenças nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 em circulação nos doentes de Alzheimer. Encontraram um aumento significativo nos níveis de produção destas citocinas *in vitro*, após estimulação com LPS, no grupo DA quando comparado com o grupo controlo. Os doentes de Alzheimer apresentaram também uma diminuição significativa na quantidade de células a expressarem CD8 e um aumento significativo na quantidade de células a expressarem CD4, o que não se verifica no nosso estudo [367].

Huberman *et al* encontraram níveis inalterados de IL-1 $\beta$  a nível periférico em doentes de Alzheimer *versus* controlos, após estimulação com 10  $\mu$ g/ml de LPS, e uma redução significativa da libertação de TNF- $\alpha$  na DA moderada após 96 horas de incubação na presença de 10  $\mu$ g/ml de PHA [368]. No entanto, também foram encontradas produções aumentadas de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por células do sangue total estimuladas com LPS em doentes de Alzheimer [369].

As alterações imunológicas encontradas em doentes de Alzheimer a nível periférico podem traduzir uma activação imunológica a nível cerebral, dada a existência de vias de sinalização inflamatória do cérebro para a periferia [370]. Recentemente, um estudo onde



foi realizada uma injeção intracerebroventricular de Abeta1-42 em ratinhos demonstrou que esta provocou um aumento de IL-6 não só no cérebro, mas também no plasma, o que demonstra que a administração central de Abeta 1-42 induz efectivamente uma resposta sistémica [371]. Para além disto, as alterações imunológicas periféricas podem ser correlacionadas com uma deposição progressiva de Abeta 1-42 no SNC [372]. Alternativamente, a Abeta em circulação pode afectar directamente as funções imunológicas. Apesar de alguns autores descreverem níveis inalterados de Abeta 1-42 no plasma de DA esporádicos, um estudo longitudinal em controlos idosos mostrou que os níveis de Abeta plasmática, de uma forma geral, aumentam com a idade, o que sugere que estes já poderão estar elevados muito antes do desenvolvimento da DA e, subsequentemente, decrescerem à medida que a doença progride [373, 374]

Uma vez que as citocinas são moléculas com um elevado grau de regulação por reciprocidade, actuando em cascata na indução ou inibição da sua síntese, é extremamente difícil atribuir funções específicas para cada uma delas, bem como identificar o primeiro factor a desencadear as alterações inflamatórias observadas na DA. É no entanto possível concluir que a nível periférico existe uma activação de mediadores de inflamação. Esta conclusão poderá, eventualmente, ter uma repercussão a nível terapêutico, ainda mais quando foi demonstrado que doentes de Alzheimer após 1 mês de tratamento com inibidores da acetilcolinesterase apresentavam níveis periféricos mais baixos das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6. Estes resultados sugerem um envolvimento destes inibidores na modulação da resposta inflamatória periférica, com potenciais efeitos benéficos na DA [375]. Para além disto, a combinação de um antioxidante natural (vitamina E) e de um anti-inflamatório suprimiu as respostas inflamatórias e de stresse oxidativo em cérebros de ratinhos Tg2576. Este efeito foi acompanhado por reduções significativas nos níveis de A $\beta$  no neocórtex e hipocampo destes animais [376].

### ***Expressão de proteínas de morte celular***

#### **Bax/Bcl2**

A análise dos resultados obtidos neste estudo evidencia a inexistência de diferenças significativas ao nível dos parâmetros estudados relacionados com a expressão das

proteínas Bax e Bcl2 nos linfócitos de doentes de Alzheimer, indivíduos com DCL e controlos. Apenas a percentagem de linfócitos B se apresentou significativamente diminuída no grupo DA quando em comparação com o grupo controlo. Apesar de não ser significativo, o grupo DCL tanto a nível de linfócitos B como NK apresenta um aumento nas quantidades de Bax e Bcl2 a serem expressas. Estes valores poderão representar uma maior actividade celular neste grupo quando comparado com os grupos controlo e DA.

Apesar de não termos identificado diferenças entre os três grupos em estudo, a nível das células do sangue periférico, vários estudos descreveram o aumento da expressão de proteínas relacionadas com o processo apoptótico (c-Jun, c-Fax, Bax, p53, Fas, Bcl2, Bcl-xL) no tecido cerebral de doentes de Alzheimer [377-380].

Uma vez que a razão entre as moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas determina a morte *versus* a sobrevivência celular, foram determinadas as razões entre as quantidades relativas de Bax e Bcl2 [381]. Um aumento nesta razão indica um favorecimento da apoptose [382]. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos, mas de uma forma global podemos dizer que os granulócitos são o tipo celular mais sensível à apoptose por intermédio do sistema Bax/Bcl2. Seguem-se os monócitos, os linfócitos B e NK com valores muito semelhantes e por último aqueles que apresentam maior resistência à apoptose, os linfócitos T. Estes resultados estão de acordo com o facto bem conhecido dos neutrófilos serem as células sanguíneas com um período médio de vida mais curto. Os neutrófilos humanos expressam de forma constitutiva várias proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl2. Estas proteínas têm uma vida média relativamente prolongada, o que pode explicar o facto dos neutrófilos apresentarem uma sensibilidade aumentada para a apoptose mediada por Fas comparativamente aos outros leucócitos sanguíneos [383, 384].

Para além dos efeitos apoptóticos destas proteínas, a sinalização através do TNF- $\alpha$  encontra-se na bifurcação das vias pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Na verdade tem sido descrito que esta citocina tem duas acções diferentes a nível da apoptose encontrada nos neutrófilos. Ou seja, por um lado induz a apoptose numa subpopulação destas células susceptíveis e por outro lado atrasa a apoptose nas restantes [382].

O mesmo efeito pode ser observado nos linfócitos. Sabe-se que o envelhecimento é caracterizado por uma linfopenia, disfunção das células T e aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ . Foi também descrito em indivíduos idosos que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

apresentavam uma susceptibilidade aumentada para iniciarem um processo apoptótico induzido por TNF- $\alpha$  [385].

A análise gráfica dos resultados obtidos nos três tempos de avaliação relativa à expressão das proteínas Bax e Bcl2 permitiu concluir que dos três subtipos linfocitários estudados, aqueles cujas percentagens médias de células apresentam maiores diferenças ao longo do tempo são os linfócitos NK.

De uma maneira geral, ao longo do tempo parece haver uma tendência para a diminuição da quantidade de Bax expresso a nível de granulócitos, monócitos e linfócitos. Pelo contrário, os níveis de Bcl2 tendem a aumentar em todas estas células à excepção dos granulócitos. Estes dados sugerem que, provavelmente, a morte por apoptose induzida por Bax, a nível das várias células sanguíneas, ocorrerá de uma forma mais acentuada no início do processo de Defeito Cognitivo Ligeiro.

### **Fas/FasL**

Outros estudos sugeriram que o aumento de apoptose, com sobre-expressão de Fas, FasL e Bax e diminuição da expressão de Bcl2, poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela linfopenia associada com o envelhecimento humano [386]. Esta associação não poderá ser feita com a doença de Alzheimer e com o DCL, uma vez que os resultados obtidos relativos à expressão das proteínas Fas e FasL pelos vários subtipos linfocitários demonstraram a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos estudados. Um outro estudo encontrou níveis alterados de anticorpos anti-Fas no soro de indivíduos com esclerose lateral amiotrófica e de doentes de Parkinson, mas não no soro de doentes de Alzheimer [387]. Pelo contrário, Richartz *et al* reportaram níveis de CD95 significativamente elevados no soro de doentes de Alzheimer quando em comparação com controlos [388].

Os nossos resultados apresentaram uma grande variação interindividual, principalmente nos parâmetros relativos à expressão de FasL pelos linfócitos T, onde muitos indivíduos apresentaram valores nulos. Assim sendo, apenas serão discutidos aspectos gerais destes resultados, não tendo sido feita qualquer correlação entre variáveis.

É de notar que nos três tipos linfocitários estudados, a percentagem de células a expressarem FasL é maior no grupo DCL, quando comparada com os outros dois grupos, apresentando o grupo controlo os valores mais baixos entre os três.

Ao compararmos a expressão destas proteínas nos três subtipos celulares em estudo, podemos concluir que a percentagem de linfócitos B a expressarem Fas e FasL é semelhante. O mesmo acontece com as quantidades destas proteínas, ou seja, a nível de linfócitos B há valores de MIF semelhantes para Fas e FasL. Pelo contrário, a percentagem de linfócitos T e NK que expressa Fas é muito maior do que a percentagem destes mesmos linfócitos que expressa FasL. Relativamente às quantidades de Fas e FasL, os linfócitos T apresentam valores de MIF superiores para Fas, enquanto os linfócitos NK apresentam valores superiores para FasL. Isto sugere a existência de muitos linfócitos NK a expressarem uma pequena quantidade de Fas e uma pequena percentagem de linfócitos NK a expressar uma grande quantidade de FasL. Os linfócitos T são o subtipo linfocitário que expressa maior quantidade de Fas, o que está de acordo com estudos previamente realizados. Por outro lado, este tipo linfocitário expressa, também uma menor quantidade de FasL, apesar desta proteína ser muito pouco expressa por qualquer das subpopulações linfocitárias estudadas [389]. Lombardi *et al* encontraram uma diminuição na expressão da proteína Fas no subtipo linfocitário CD8+ nos doentes de Alzheimer após estimulação. Os nossos resultados apresentam também uma diminuição nas quantidades desta proteína a nível dos linfócitos T, no grupo DA, embora esta não seja significativa. No entanto, em termos de percentagens de células, o grupo DA apresenta-se muito semelhante ao grupo controlo, tal como também foi descrito por aqueles autores [367].

De uma forma geral, ao compararmos as diferenças entre os três grupos relativamente aos parâmetros estudados em monócitos e aos parâmetros associados à expressão de Fas e FasL, podemos concluir que no primeiro caso as diferenças são maiores quando comparamos os grupos DCL e DA, enquanto no segundo caso são encontradas diferenças mais acentuadas entre os grupos controlo e DCL. Esta evidência sugere uma maior aproximação, a nível inflamatório, dos grupos controlo e DCL, enquanto a nível da expressão de proteínas envolvidas na morte celular os grupos DCL e DA parecem estar num estadio semelhante.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças nos níveis de expressão de Fas e FasL nas células linfocitárias entre os três grupos em estudo, outros estudos encontraram evidências da presença de Fas tanto em neurónios com tranças neurofibrilares, como em neurónios sem tranças neurofibrilares no córtex frontal de doentes de Alzheimer, uma sobre-regulação de FasL, alterações na imunorreactividade para Fas e uma sobre-expressão

de FasL nas placas senis [390-392]. Martinez *et al* encontraram um aumento significativo nas concentrações de Fas solúvel no LCR de doentes de Alzheimer quando em comparação com controlos. Demonstraram também a elevação da concentração de IL-6 na mesma matriz biológica e uma correlação entre os níveis destas duas proteínas [393]. Estas evidências sugerem um envolvimento das proteínas Fas e FasL nos processos neuropatológicos que ocorrem nos cérebros de doentes de Alzheimer, quer seja um envolvimento a nível da morte celular por apoptose, ou um envolvimento na tentativa de neuroregeneração deste tecido. Os nossos resultados mostram, no entanto, não haver uma correspondência a nível periférico destes processos, mais especificamente, nos níveis de expressão de Fas e FasL nos linfócitos.

A análise gráfica dos valores encontrados para a expressão destas proteínas permitiu concluir que de uma forma global, os três subtipos linfocitários, apesar de não apresentarem um padrão constante a nível da percentagem de células, apresentam uma tendência para um aumento da quantidade de Fas e FasL a serem expressos ao longo do tempo. Estas evidências permitem concluir que, provavelmente, ao longo do tempo uma menor quantidade de células expressa quantidades cada vez mais elevadas destas proteínas.

Os indivíduos com DCL apresentam, a nível linfocitário e ao longo do tempo, uma expressão de proteínas da família Bax/Bcl2 com cada vez menos significância, sendo cada vez mais importante o sistema Fas/FasL na indução de sinais de morte/sobrevivência nestas células.

### ***Parâmetros de stresse oxidativo***

A DA é uma doença multifactorial, complexa em que diferentes mecanismos contribuem para a morte celular. O stresse oxidativo tem sido descrito como uma condição extremamente importante que precede a morte celular [266].

O aumento do stresse oxidativo pode ser induzido durante condições de excitotoxicidade, durante processos inflamatórios e durante distúrbios vasculares [277, 394, 395]. Estas condições podem, por sua vez, ser afectadas por um grande número de influências ambientais e do estilo de vida, tais como a quantidade de vitaminas ingeridas na dieta, o tabaco, o exercício físico e a exposição a pesticidas [396-398]. A contribuição

relativa de cada um destes diferentes mecanismos para a morte celular pode também ser diferente para cada indivíduo.

A ocorrência de stresse oxidativo na DA tem sido extensivamente demonstrada por vários estudos que descrevem um aumento de produtos da oxidação de lípidos, proteínas e DNA no sangue e em amostras de tecido cerebral de doentes de Alzheimer quando em comparação com controlos. Adicionalmente, a determinação dos níveis de um largo espectro de antioxidantes periféricos – que é considerada uma forma apropriada de olhar para o stresse oxidativo em várias doenças humanas – levou à descoberta de um estado antioxidante marcadamente diminuído nos doentes de Alzheimer [399, 400].

Enquanto existem evidências sólidas de que o stresse oxidativo desempenha um papel extremamente importante na DA, o mesmo não pode ser dito no que concerne à hiperprodução de espécies reactivas de oxigénio e azoto no DCL [401]. Foram no entanto encontrados níveis significativamente elevados de isoprostanos no LCR, plasma e urina de indivíduos com DCL quando comparados com controlos, o que sugere que a peroxidação lipídica é um evento que ocorre no início dos processos patogénicos da doença [402, 403].

O nosso trabalho permitiu encontrar diferenças nos níveis de alguns parâmetros de stresse oxidativo estudados nos grupos controlo, DCL e DA. Assim, a nível plasmático, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis das defesas antioxidantes não enzimáticas, GSSG e vitamina E. No primeiro caso estas diferenças verificaram-se entre o grupo controlo e os outros dois grupos. Os níveis de vitamina E apresentaram-se significativamente diferentes entre o grupo DA e o grupo controlo.

A nível de marcadores de oxidação apenas foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> entre o grupo controlo e o grupo DA e entre o grupo controlo e o grupo DCL, respectivamente. A nível eritrocitário os níveis de GSH, bem como a razão GSH/GSSG apresentaram-se significativamente diferentes entre o grupo controlo e os outros dois grupos em estudo.

A vitamina E é um anti-oxidante lipossolúvel capaz de interromper a cadeia de oxidação de biomoléculas, é bastante eficaz na prevenção da lipoperoxidação e de outros eventos oxidativos derivados de radicais livres [404]. Pode bloquear a produção de peróxido de hidrogénio bem como a citotoxicidade daí resultante. Esta vitamina reduz a morte celular induzida pela  $\beta$ -amilóide em culturas de células do hipocampo de ratinhos e em células PC12 e atenua a toxicidade induzida por aminoácidos excitatórios em células de

neuroblastoma [283, 405, 406]. Os seus níveis estão inversamente relacionados com a *performance* cognitiva de indivíduo idosos [407]. Um ensaio clínico demonstrou que, quando em comparação com placebos, uma dose diária de 2000 unidades de vitamina E administrada durante dois anos, atrasou significativamente a progressão de um número importante de situações clínicas características da DA (progressão para DA severa, perda da capacidade de desempenhar as tarefas diárias, institucionalização ou mesmo a morte) [408].

Os nossos resultados mostram, a nível plasmático, níveis de vitamina E significativamente mais baixos no grupo DA, o que está de acordo com estudos previamente realizados [281, 409-411]. Bourdel-Marchasson *et al* descreveram a nível eritrocitário uma diminuição da concentração desta vitamina. Os nossos resultados, pelo contrário, mostram que a concentração desta vitamina é mais baixa no grupo controlo e mais elevada no grupo de doentes de Alzheimer [281]. O grupo DCL apresenta níveis intermédios entre estes dois grupos tanto a nível plasmático como eritrocitário.

A absorção de vitamina E é facilitada pela digestão de gordura da dieta. No sangue, a vitamina E é transportada em associação com lipoproteínas, principalmente LDL e HDL [412]. Assim, foram determinados os níveis de colesterol total no plasma e posteriormente foi calculada a razão vitamina E/colesterol. Os níveis de colesterol não apresentaram grandes diferenças entre os três grupos, ao contrário do que tem sido descrito, principalmente devido ao efeito da sobre-representação do alelo E4 da ApoE nos doentes de Alzheimer [413]. A razão vitamina E/colesterol apresentou valores mais elevados no grupo controlo e mais baixos no grupo DA, com o grupo DCL mais uma vez entre os outros dois grupos, à semelhança do que aconteceu com os níveis de vitamina E plasmáticos.

A vitamina A é também uma vitamina lipossolúvel, cuja molécula básica é o retinol. É um *quencher* muito eficiente do oxigénio singlete e um destruidor de radicais peróxido. Ono *et al* demonstraram que esta vitamina inibe a formação de fibrilas de A $\beta$  e estabiliza as fibrilas já formadas de uma forma dependente da dose [414]. Outros estudos encontraram valores significativamente diminuídos desta vitamina em doentes de Alzheimer e em indivíduos com DCL, quando comparados com indivíduos controlo [409-411]. No nosso estudo, esta vitamina apresentou valores médios muito semelhantes embora ligeiramente superiores no grupo controlo relativamente aos grupos DA e DCL com este

último a apresentar valores intermédios.

Estes níveis mais baixos de vitaminas A e E nos doentes de Alzheimer podem ser resultado de uma dieta pobre nestes nutrientes [281], uma vez que estas vitaminas são totalmente absorvidas da alimentação e não tendo sido tido em conta o tipo de dieta praticado por cada indivíduo participante neste estudo.

O glutatião é capaz de proteger as células contra as espécies reactivas de oxigénio (ROS), iões de metais e produtos da peroxidação lipídica reactivos associados com a DA. As ROS são reduzidas pelo glutatião (GSH) na presença de peroxidase do glutatião. Como resultado o GSH é oxidado a GSSG, o qual por sua vez é rapidamente reduzido a GSH por acção da redutase do glutatião [415].

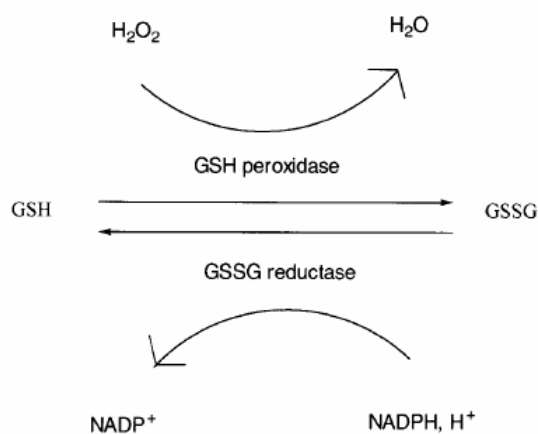


Figura 52. Ciclização do glutatião reduzido (GSH) e oxidado (GSSG) [415].

O monóxido de azoto (NO) desempenha diversos papéis fisiológicos, mas a produção excessiva deste composto é perigosa para os neurónios. Níveis excessivos de NO são capazes de induzir a heme oxigenase-1, uma proteína de stresse que degrada o heme em monóxido de carbono e biliverdina [416, 417]. As concentrações intracelulares de glutatião parecem ser um factor importante na regulação da susceptibilidade das células ao NO e seus derivados. O NO reage com o superóxido para formar peroxinitrito e também reage com o glutatião levando à formação de glutatião oxidado. Se os níveis de glutatião estiverem diminuídos, devido a condições severas de stresse oxidativo como aqueles encontrados na DA, os neurónios tornam-se particularmente sensíveis ao NO e ao  $\text{ONOO}^-$ .

Na DA, o glutatião oxidado está aumentado, enquanto a actividade da transferase do glutatião está diminuída, o que é consistente com o conhecido aumento de stresse oxidativo nesta doença [418]. Os nossos resultados comprovam este aumento de GSSG ao nível do



plasma dos doentes de Alzheimer. No entanto, os níveis de GSH tanto no plasma como nos eritrócitos são mais elevados no grupo DA. O grupo DCL apresenta valores intermédios entre o grupo controlo e o grupo DA. A razão entre os níveis de GSH e GSSG apresenta-se mais elevada no grupo controlo a nível do plasma, enquanto nos eritrócitos esta razão se encontra mais elevada no grupo DA.

Estes resultados sugerem uma activação significativa do ciclo do glutatião na DA ligeira e DCL. Os valores mais elevados de GSH e da razão GSH/GSSG a nível eritrocitário no grupo DA sugerem a existência de uma resposta celular ao stresse oxidativo, à semelhança do que acontece com a vitamina E. Como já foi referido os níveis de GSSG plasmáticos são mais elevados no grupo DA, mas a nível eritrocitário este grupo apresenta os valores mais baixos de glutatião oxidado, o que está de acordo com uma resposta celular antioxidante.

Rinaldi *et al* descreveram uma marcada diminuição nos níveis plasmáticos de defesas antioxidantes no DCL e na DA com ausência da indução das enzimas antioxidantes peroxidase do glutatião e superóxido dismutase. Os doentes apresentaram níveis de actividade destas enzimas diminuídos em relação aos controlos [409]. As actividades destas enzimas e da catalase estavam significativamente aumentadas no lobo temporal medial onde a peroxidação lipídica era mais pronunciada e as alterações histopatológicas mais severas na DA [419]. Estes dados sugerem um aumento da actividade antioxidante em resposta à formação aumentada de radicais livres, na tentativa de manter o estado redox em doentes de Alzheimer [295, 420]. Outro estudo comparou as actividades da GIPx, num grupo de doentes de Alzheimer, em dois tempos diferentes de evolução da doença. Ao fim de cinco anos estes doentes apresentaram actividades diminuídas desta enzima [296].

Em ratos envelhecidos tem sido descrita a diminuição das enzimas antioxidantes como a SOD, a catalase e a redutase do glutatião, com um aumento concomitante da peroxidação lipídica e proteica e dos níveis de glutatião oxidado [421]. Outro estudo não encontrou diferenças significativas nos níveis eritrocitários da actividade da GRed, no entanto foi descrita uma actividade significativamente aumentada da GIPx nos doentes de Alzheimer quando em comparação com controlos, tendo os níveis de actividade desta enzima sido correlacionados negativamente com a idade dos doentes [422].

Os nossos resultados mostram valores contrários aos encontrados por Rinaldi *et al*, parecendo haver um ligeiro aumento nas actividades das enzimas peroxidase do glutatião e

redutase do glutatíão a nível eritrocitário, no grupo DA. Estes valores estão, no entanto, de acordo com as evidências encontradas a nível cerebral, sugerindo uma possível resposta celular ao aumento da produção de espécies oxidativas. Este aumento a nível de defesas antioxidantes enzimáticas poderá, eventualmente, também explicar o facto de não terem sido encontrados níveis mais elevados nos grupos DCL e DA de marcadores de oxidação lipídica e proteica. Por outro lado, e apesar de terem sido encontrados níveis diminuídos em indivíduos com DCL por Rinaldi *et al*, o estudo de Delibas *et al* [296, 409] parece sugerir a diminuição da actividade da GPx com o avançar da doença.

O ácido úrico advém da degradação das purinas através da acção da enzima xantina oxidase. As propriedades antioxidantes do ácido úrico têm sido atribuídas à sua capacidade de quelatar iões metálicos e de reagir com potentes oxidantes biológicos como radicais hidroxilo, aniões superóxido, ácido hipoclorico, peroxinitritos, entre outros, de forma a produzir produtos relativamente estáveis [423, 424].

Rinaldi *et al* encontraram níveis de ácido úrico significativamente inferiores em doentes de Alzheimer e indivíduos com DCL quando comparados com um grupo controlo [409]. Hensley *et al* encontraram níveis globais de ácido úrico diminuídos nos cérebros de doentes de Alzheimer e no fluido ventricular [425]. Polidori *et al* também descreveram uma diminuição significativa de ácido úrico em doentes de Alzheimer quando em comparação com indivíduos controlo [411].

O nosso estudo, apesar de não encontrar diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos, permite concluir que as concentrações de ácido úrico no plasma dos doentes de Alzheimer e dos indivíduos com DCL são muito semelhantes entre si e mais baixas do que aquelas encontradas no grupo controlo.

A capacidade antioxidante total reflecte a combinação do efeito de todos os antioxidantes capazes de “quebrar” cadeias de oxidação, incluindo os grupos tiol de proteínas e o ácido úrico. Ao contrário da actividade antioxidante que se centra nos antioxidantes, a medida da capacidade antioxidante tem em atenção principalmente o radical livre que é destruído. Esta medição pode ser afectada por diferentes condições metabólicas, fisiológicas ou patológicas não necessariamente relacionadas com o stresse oxidativo, como por exemplo a quantidade de grupos sulfidrilos proteicos, a concentração de ácido úrico e o consumo de tabaco. Apesar disto, a capacidade antioxidante total tem sido descrita como um marcador eficiente das alterações de stresse oxidativo *in vivo*, que

poderão não ser detectadas através da medição de antioxidantes isolados [426].

No nosso estudo, a capacidade antioxidante total é maior a nível do grupo controlo do que dos outros dois grupos, tendo estes, diferenças muito pequenas entre si. Foy *et al* não encontraram alterações significativas entre doentes de Alzheimer e controlos a nível da capacidade antioxidante total [410]. Estes resultados sugerem que neste caso, este parâmetro não traduz o conjunto das alterações oxidativas individuais que ocorrem nesta patologia.

As ROS podem “atacar” os resíduos de aminoácidos, particularmente prolina, arginina, lisina e treonina, para produzirem derivados carbonilo ( $>C=O$ ). Para além disto, os grupos carbonilo podem ser introduzidos nas proteínas por reacções com aldeídos (HNE, MAD) produzidos através da peroxidação lipídica ou com derivados carbonilo reactivos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como consequência das reacções de redução de açúcares [427, 428]. Assim, a presença de grupos carbonilo nas proteínas pode ser usada como marcador de oxidação proteica mediada por espécies reactivas. No entanto, Polidori *et al* não encontraram diferenças significativas nos níveis de grupos carbonilo de IgG entre os grupos DA e controlo [411]. De forma semelhante, Granot e Kohen não detectaram níveis significativamente diferentes de grupos carbonilo, entre doentes com abetalipoproteinémia e indivíduos controlo [429]. No entanto, a nível cerebral foram descritos processos de oxidação proteica nos doentes de Alzheimer, bem como de outras patologias neurodegenerativas [430].

Os nossos resultados indicam também a inexistência de diferenças significativas nos níveis de grupos carbonilo entre os três grupos estudados. Os marcadores de oxidação proteica, ao contrário do que era esperado, não se encontram mais elevados nos grupos DA e DCL relativamente ao grupo controlo. Pelo contrário, o grupo DA apresentou os valores médios mais baixos entre os três.

O malonildialdeído é formado durante a degradação oxidativa de algumas macromoléculas, como produto da geração de radicais livres pela radiação ionizante, *in vivo* e como produto da biossíntese de prostaglandinas. No entanto, uma vez que a maior fonte de MDA é a peroxidação de ácidos gordos polinsaturados, este é considerado um marcador da peroxidação lipídica.

Foram encontrados níveis de MDA significativamente elevados em amostras de urina de doentes com Síndrome de Down quando em comparação com controlos [431].

Cecchi *et al* mostraram uma elevação nos níveis de produtos de lipoperoxidação como o 4-HNE e o MDA em fibroblastos e linfoblastos de indivíduos com doença de Alzheimer familiar, quando comparados com controlos [432]. Delibas *et al* encontraram níveis eritrocitários de MDA elevados num grupo de doentes de Alzheimer ao efectuarem um estudo longitudinal e compararem os níveis deste marcador de lipoperoxidação cinco anos após a primeira avaliação. Para além disto verificaram que estes níveis se correlacionavam negativamente com os valores obtidos na escala MMSE [296]. Bet *et al*, ao determinarem os níveis de MDA em plaquetas com e sem estimulação, concluíram que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DA e controlo, apresentando o grupo controlo níveis mais elevados deste marcador, nos ensaios realizados sem estimulação plaquetária. No entanto, após estimulação, os doentes de Alzheimer apresentaram níveis significativamente diminuídos [433].

Pela observação dos nossos resultados pode concluir-se que os níveis de MDA tanto no plasma como nos eritrócitos estão mais elevados nos controlos do que nos outros dois grupos. O grupo DCL apresenta níveis de MDA intermédios entre os outros dois grupos.

O monóxido de azoto (NO) é uma molécula de sinalização envolvida em várias respostas biológicas, desde a hemostase cardiovascular e regulação da pressão sanguínea à aprendizagem e memória. Foi inicialmente descoberta como a molécula responsável pela actividade bactericida dos macrófagos. O NO é um radical com uma vida média de curta duração, devido à sua reactividade com outros constituintes intracelulares como o anião superóxido, e é produzido em diferentes tecidos por isoformas específicas da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS). A reacção entre o NO e o anião superóxido resulta na formação do anião peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual é citotóxico. Esta reacção é extremamente favorável de tal forma que o NO pode efectivamente competir com a superóxido dismutase [434].

As principais isoformas da NOS nos mamíferos são a nNOS (NOSI), a iNOS (NOSII) e a eNOS (NOSIII). Apesar de todas as formas catalisarem a produção de NO através da mesma via bioquímica, elas variam relativamente à sua expressão nos tecidos e relativamente aos requisitos necessários para a sua activação. A produção de NO está associada à activação de guanil ciclase solúvel e à iniciação de várias cascatas de sinalização. LPS ou citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF) actuam através de receptores da superfície celular de células imunes, particularmente macrófagos e outras células como as

células endoteliais, e activam a iNOS. Assim, os processos de neuroinflamação patológica parecem ser responsáveis por um ciclo vicioso no qual a inflamação glial leva à produção de NO. Isto pode resultar na libertação de NO a nível dos neurónios, provocando a libertação de glutamato, o qual por sua vez permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovendo a formação de mais NO, por activação da nNOS dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  [435].

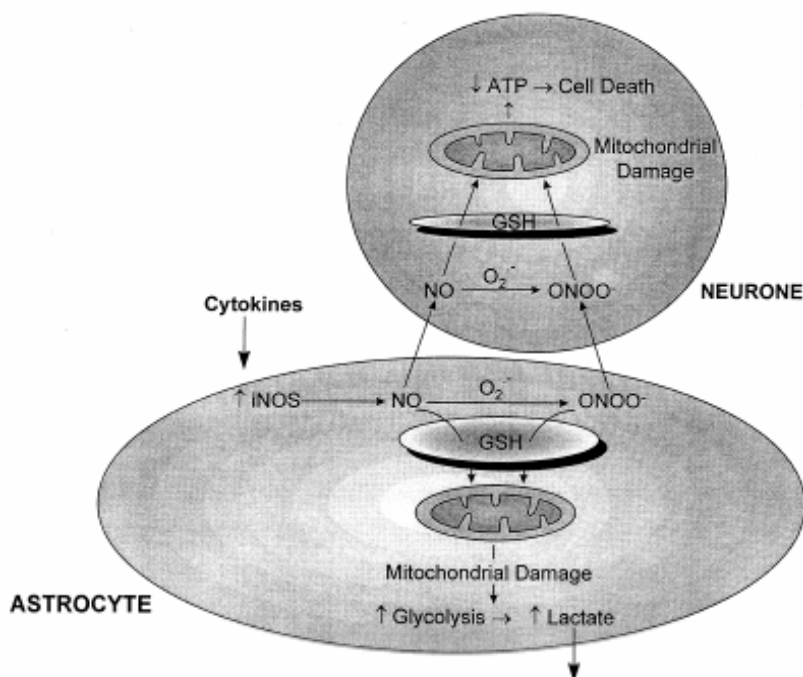


Figura 53. Dano neuronal resultante da geração de NO e  $\text{ONOO}^-$  pelos astrócitos, após exposição destes a citocinas [436].

O compromisso da respiração mitocondrial pode provocar a formação de anião superóxido, o qual reage com o NO para formar peroxinitrito, um potente oxidante. Este pode causar danos oxidativos irreversíveis nas células neuronais [437-439].

No sistema nervoso central o NO desempenha funções determinantes na neurotransmissão e na memória, mas níveis excessivos desta molécula induzem neurotoxicidade e apoptose em vários tipos de neurónios. Assim, devido às suas características biológicas o NO pode ser considerado uma “faca de dois gumes”, actuando a nível do SNC como mensageiro fisiológico essencial, mas também como agente citotóxico [440].

Na DA a presença de resíduos de nitrotirosina tem sido descrita como um indicador da formação de NO na progressão da doença. Foram também encontradas células

imunorreactivas para a iNOS a nível das tranças neurofibrilares, colocalizando-se esta enzima com resíduos de nitrotirosina em astrócitos, no tecido cerebral de doentes de Alzheimer. No entanto, estes resíduos encontrados no tecido cerebral de doentes de Alzheimer não foram encontrados em cérebros de controlos com idades semelhantes [441]. Tem sido também descrita a inibição do complexo IV no córtex cerebral destes doentes [442]. Esta perda de actividade pode resultar da acumulação de  $\beta$ -amilóide, não tendo sido descrito que esta proteína iniba directamente o complexo IV em mitocôndrias cerebrais isoladas [443]. O poder desta inibição parece aumentar na presença de RNS e, por outro lado, a  $\beta$ -amilóide também estimula a produção de NO pelas células gliais [444].

Apesar das evidências da activação do metabolismo do NO na DA, a análise da concentração de nitratos e nitritos no LCR revelou níveis comparáveis entre doentes de Alzheimer e controlos [445]. Esta observação naturalmente não implica a inexistência de um papel do NO na etiologia da DA. Implica, mais provavelmente, que a formação destas moléculas ocorra de uma forma localizada e com uma magnitude insuficiente para causar o aumento nas concentrações de nitratos e nitritos do LCR. No entanto, Selley encontrou níveis significativamente aumentados de NO no plasma de doentes de Alzheimer, quando em comparação com controlos. Estes resultados representam a concentração total de NO, não fazendo a diferenciação entre nitratos e nitritos [446, 447]. Estes são produtos estáveis da degradação do NO e do  $\text{ONOO}^-$  e, consequentemente trazem vantagens a nível dos doseamentos em fluidos biológicos [436].

Os nossos resultados demonstraram níveis significativamente aumentados de  $\text{NO}_2$  no grupo DA relativamente ao grupo controlo. O grupo DCL apresentou níveis intermédios entre estes dois. Relativamente ao  $\text{NO}_3$  este último grupo apresentou as concentrações mais elevadas e o grupo controlo apresentou valores significativamente diminuídos relativamente ao grupo DCL. Os valores de nitratos e nitritos, em conjunto, (dados não apresentados) estão também significativamente aumentados no grupo DCL quando em comparação com o grupo controlo.

Assim, estes resultados sugerem que a activação do metabolismo do NO, a nível do SNC, na doença de Alzheimer se traduz a nível periférico. Pode também concluir-se que a activação deste metabolismo ocorre ainda na fase de DCL, mantendo-se significativamente aumentado na DA ligeira.

### ***Estudo genético***

Tem sido demonstrado que vários polimorfismos de algumas citocinas inflamatórias aumentam o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer. Todos os polimorfismos são, por definição, relativamente frequentes na população em geral, pelo que existe uma forte probabilidade que um determinado indivíduo venha a herdar um ou mais destes alelos de alto risco. Os polimorfismos nos genes de citocinas, principalmente aqueles em regiões regulatórias, podem ser relacionados com as quantidades de citocinas produzidas. Uma vez que eles segregam independentemente, cada pessoa tem um perfil individual de resposta, o que pode contribuir para a susceptibilidade individual a condições inflamatórias, incluindo a DA [448].

Quando dois ou mais polimorfismos que se encontram em *linkage disequilibrium* são estudados simultaneamente, o risco aumenta substancialmente quando em comparação com a análise individual de cada um dos polimorfismos. Nalguns casos estes polimorfismos foram também associados a patologias inflamatórias periféricas. De uma maneira geral eles correlacionam-se com a produção aumentada do produto proteico. A implicação global assenta no facto de indivíduos que possuam um ou mais destes alelos de risco serem hipersensíveis a patologias que provocam uma resposta inflamatória crónica com consequente vulnerabilidade a processos auto-destrutivos.

Existem dois problemas principais associados a estes tipos de resultados. O primeiro recai no facto de não poder ser feita uma distinção entre o polimorfismo propriamente dito e uma variação genética que se encontre na vizinhança deste e que esteja em equilíbrio com ele. O segundo tem a ver com o facto de estudos deste género serem mais susceptíveis a erros estatísticos do tipo I (rejeição de  $H_0$ , quando  $H_0$  é verdadeira) e do tipo II (aceitação de  $H_0$ , quando  $H_0$  é falsa). No futuro será importante determinar certos factores que possam ter influência nos resultados, como a influência das etnias na distribuição de frequências alélicas e a existência de doença latente nas populações controlo.

Normalmente, o alelo 4 da apolipoproteína E é considerado um factor modulador que pode ter influência nos resultados genéticos da doença de Alzheimer, no entanto, outros polimorfismos poderão ter um efeito semelhante [449]. Muitos dos estudos de associação encontrados na bibliografia que envolvem polimorfismos das citocinas e a doença de Alzheimer apresentam resultados contraditórios. É portanto de todo interesse tentar

concluir acerca das influências que estes factores podem ter a nível de uma doença como a DA.

Os estudos de associação aqui apresentados, que tinham como objectivo realizar a comparação das frequências de genótipos e alelos nos grupos de doentes e controlos, deram origem a alguns resultados significativos. Verificou-se, em primeiro lugar, que todas as populações em estudo se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Mais concretamente, no que diz respeito a dois dos polimorfismos estudados no gene TNFA (nas posições -857 e -238), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de doentes e o grupo controlo. No que concerne ao polimorfismo na posição -308 foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,03$ ) entre os grupos DA com idade de início da doença inferior a 65 anos e o grupo controlo, relativamente à distribuição alélica, com o alelo C a estar sobre-representado no grupo de doentes. Foram ainda encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo DCL e o grupo controlo, relativamente à distribuição de genótipos nestes dois grupos com uma sobre-representação dos genótipos CC e TT e uma sub-representação do genótipo em heterozigotia CT no grupo de doentes. A análise de haplótipos (dados não apresentados) relativa a estes três polimorfismos demonstrou a inexistência de associação entre o haplótipo em estudo e a doença de Alzheimer, ao contrário de outros estudos que mostram uma associação significativa [450, 451].

A investigação dos polimorfismos do gene TNFA foi iniciada depois do *screening* do genoma ter sugerido uma associação putativa da DA com uma região no cromossoma 6p21.3, a qual se localiza perto deste gene. Para além disto, o alelo A do polimorfismo localizado na posição -308 do promotor do gene TNFA foi previamente associado com doenças autoimunes e inflamatórias, sendo também conhecido por ter uma maior actividade transcripcional que o alelo G [452]. De forma semelhante, o alelo 2 do microsatélite do TNFA foi associado com uma secreção aumentada de TNF e com uma susceptibilidade aumentada para a artrite reumatóide. Não foram descritas associações entre o polimorfismo na posição -238 da região promotora deste gene e a DA [449]. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que o alelo A deste polimorfismo estava associado de forma significativa com uma diminuição na actividade transcripcional [453].

Collins *et al* genotiparam 145 famílias com elevado risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer, consistindo num total de 562 irmãos afectados e não afectados, de



maneira a determinarem a associação destes três polimorfismos com a DA. Encontraram uma associação significativa do alelo 2 do microssatélite do TNFA com a DA, mas o haplótipo 2-1-2 para os polimorfismos -308, -238 e microssatélite apresentava uma associação ainda mais forte [451]. Alvarez *et al* genotiparam 315 doentes de Alzheimer e 400 controlos de origem espanhola para os polimorfismos -308 e -238. Não encontraram associações entre os polimorfismos e o risco de desenvolver a doença. No entanto, os indivíduos com o alelo A do polimorfismo -308 apresentaram uma média de idade de início da doença 3 anos inferior, quando comparados com aqueles que não possuíam este alelo, sugerindo um efeito deste polimorfismo na idade de início da DA [454].

Relativamente aos polimorfismos estudados no gene IL6 não foram encontradas quaisquer associações estatisticamente significativas. Podemos pois concluir que provavelmente, na população portuguesa, este polimorfismo não será um factor de risco para o desenvolvimento de DA.

A interleucina 6 é uma citocina inflamatória muito potente que é dificilmente detectada no SNC de indivíduos saudáveis. No entanto, é rapidamente induzida em várias situações patológicas. O gene da IL-6 localiza-se no cromossoma 7p21 e nele existem vários polimorfismos, entre os quais, os polimorfismos situados na posição -174 da região promotora e na posição -572. O primeiro destes polimorfismos foi previamente associado com a concentração desta citocina no plasma, bem como com os níveis de sIL-6R, uma glicoproteína que faz parte do complexo receptor desta citocina e que por esta razão intervém nos seus efeitos [455, 456]. Apesar de um estudo não ter apresentado uma associação deste polimorfismo com a DA, foi descrita uma associação marginal entre este polimorfismo e o risco de desenvolvimento de DA em doentes de Alzheimer ApoE4 positivos [457, 458]. Shibata *et al* determinaram a influência deste mesmo polimorfismo em 128 doentes de Alzheimer e 83 controlos de origem japonesa mostrando que o alelo G se encontrava significativamente sobre-representado no grupo de doentes. Estes doentes apresentavam também uma tendência para níveis plasmáticos aumentados desta citocina [459]. Pelo contrário, Licastro *et al* descreveram um efeito semelhante de sobre-representação de um alelo na população do norte de Itália. No entanto, o alelo nestas condições, no grupo de doentes de Alzheimer era o alelo C. Para além disto, o genótipo CC apresentou-se associado com um risco aumentado de desenvolvimento da doença nas mulheres e com níveis médios aumentados desta citocina no plasma e cérebro de doentes

de Alzheimer [460].

Os nossos resultados mostraram também a inexistência de associações estatisticamente significativas entre os genótipos estudados no gene IL1B e o risco de desenvolver DA. O cromossoma 2q14-21 contém um complexo de genes relacionados com a IL-1, incluindo IL1A, IL1B e a proteína receptora antagonista IL1, os quais possuem polimorfismos significativos. Relativamente ao gene IL1B, por nós estudado, estes polimorfismos localizam-se nas posições -511 da região reguladora e +3954 do exão 5. Grimaldi *et al* usando a mesma população da genotipagem do gene IL1A encontrou o genótipo TT do polimorfismo -511 associado com um ligeiro aumento no risco de desenvolvimento de DA de início tardio. Hedley *et al*, pelo contrário, falharam na tentativa de associação deste polimorfismo com o risco de desenvolvimento de DA na população australiana. No entanto, encontraram uma maior prevalência do genótipo TT do polimorfismo +3954 nos doentes de Alzheimer com idade de início tardia [461]. Nicoll *et al* apresentaram uma associação entre o mesmo genótipo do polimorfismo +3954 e o aumento de 4 vezes na produção da IL-1 $\beta$  quando em comparação com o genótipo CC [462]. Sciacca *et al* encontraram uma associação entre os genótipos CT e TT deste polimorfismo e a antecipação de quatro a cinco anos da idade de início dos doentes de Alzheimer [463]. Noutro estudo, Licastro *et al* concluíram que os doentes de Alzheimer que possuísem o alelo T do polimorfismo +3954 e fossem ApoE4 negativos tinham quantidades diminuídas de placas amilóides e tranças neurofibrilares no tecido cerebral, idades de início e de ocorrência de morte mais avançadas e um período de duração da doença menor. Pelo contrário, o polimorfismo -511 não influenciou nenhuma destas características da DA [464]. Rosenmann *et al* não encontraram associações entre o polimorfismo +3954 e a DA, nem como um factor de risco, nem como influenciador da idade de início da doença, numa população judaica [465]. O genótipo CC, bem como o alelo C do polimorfismo -511 foram associados com sintomas psicóticos na doença de Alzheimer [466].

De forma semelhante ao que aconteceu para os polimorfismos das outras citocinas em estudo, também o polimorfismo localizado na posição +1188 do gene IL12 não apresentou qualquer associação com o desenvolvimento da DA. Do nosso conhecimento não existem estudos de associação que envolvam este polimorfismo e a doença de Alzheimer. Este polimorfismo foi estudado relativamente a outras doenças autoimunes e

inflamatórias como por exemplo a esclerose múltipla e a artrite reumatóide [337].

Foi também testada a influência dos genótipos de cada uma das citocinas estudadas na idade de início da doença através de uma análise de variância. Verificou-se a inexistência de qualquer associação entre os vários genótipos estudados e a idade de início da doença de Alzheimer nos grupos DA, DA com idade de início da doença inferior a 65 anos e DCL. Nos outros dois grupos, DA com idade de início da doença superior a 65 anos ( $p=0,026$ ) e DA com idade de início da doença superior a 65 anos e história familiar negativa ( $p=0,023$ ) foi encontrada uma associação entre os genótipos CC e CT do polimorfismo na posição -511 do gene IL1B e a idade de início da doença.

Uma vez que o grupo de doentes com história familiar negativa representa a forma esporádica da doença e que no outro grupo poderão estar envolvidos outros factores genéticos que não aqueles em estudo, foi determinada a curva de sobrevivência Kaplan-Meier com estatística *log rank* (idade média de início da doença: para CC, 70 anos; IC 95%; para CT, 74 anos; IC 95%; para TT, 70 anos; IC 95%; IL1B CT vs CC + TT  $\log rank \chi^2=7,86$ ;  $p=0,005$ ), no primeiro destes grupos. Pode ainda concluir-se que na população estudada, o genótipo CC contribui significativamente para a diminuição da idade de início da doença em quatro anos, quando comparado com o genótipo CT. Estes dados são contrários aos apresentados por Grimaldi *et al* que concluem que os indivíduos com o genótipo TT apresentam uma idade de início três anos superior quando comparados com indivíduos com genótipo CC e seis anos superior quando comparados com indivíduos com genótipo CT [467]. É no entanto interessante notar que o factor protector neste genótipo está associado com a heterozigotia. Claramente, poderia antecipar-se que a protecção seria ainda maior em casos de homozigotia. A explicação mais provável para esta evidência é a ocorrência de um erro estatístico devido ao baixo número de doentes com o genótipo TT. No entanto, existem outros estudos que descrevem a heterozigotia como factor de risco [468].

De uma maneira geral podemos concluir que na nossa população, os polimorfismos dos genes das citocinas em estudo não estão associados com o risco de desenvolvimento da DA. Como foi extensamente descrito existem vários estudos com conclusões diferentes e até opostas no que concerne às associações destes genótipos como factores de risco ou protectores a nível da doença de Alzheimer. Esta evidência poderá estar relacionada com factores de ordem clínica, metodológicos, ou de homogeneidade das populações. No

entanto, estas diferenças podem estar associadas a uma especificidade populacional, logo, a caracterização de cada população para estes factores de risco é muito importante.

Os resultados obtidos com a genotipagem ApoE mostraram que em relação aos controlos, todos os grupos de doentes apresentavam um aumento significativo da representação do alelo e4. Na população geral, este alelo encontra-se numa percentagem de cerca de 20 a 30% dos indivíduos. Em doentes de Alzheimer esta percentagem sobe para 45-60% dos doentes a apresentarem este alelo. Relativamente ao genótipo homozigótico para este alelo, ele está presente em indivíduos controlo numa percentagem de 2 a 3%, enquanto nos doentes de Alzheimer esta percentagem se situa nos 12 a 15% [469]. No nosso estudo encontrámos percentagens relativamente inferiores, ou seja 5% dos controlos apresentaram o alelo e4 em comparação com 26% dos doentes de Alzheimer. O genótipo E4E4 não foi encontrado em indivíduos controlo, mas foi apresentado por 10% dos doentes de Alzheimer. Curiosamente o grupo DCL apresentou sempre percentagens mais baixas quando comparado com o grupo DA (alelo e4 – 12% e genótipo E4E4 – 2%). Apesar destas diferenças, o alelo e4 apresentou-se sempre com uma representação significativamente aumentada nos vários grupos de doentes quando comparados com o grupo controlo. O risco associado a este alelo (*odds ratio*) rondou, nos grupos de doentes de Alzheimer o valor de 6, enquanto no grupo DCL este valor desceu para os 2,5. Estes valores sugerem, provavelmente, uma associação entre o genótipo ApoE e a idade de início da doença.

### ***Conclusões gerais***

A nível linfocitário, com o envelhecimento, podem ser observadas algumas alterações como a diminuição da síntese de factores de crescimento e de sobrevivência à morte celular, regulação diminuída do cálcio intracelular, expressão alterada de moléculas de superfície, defeitos na transdução de sinais, entre outros. Alguns destes parâmetros estão também alterados nos doentes de Alzheimer [470-472].

O stresse oxidativo aumenta com a idade e conduz a um dano celular. Adicionalmente, as ROS e RNS podem induzir as células a entrarem num programa de morte celular e podem actuar como segundos mensageiros por influenciarem factores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1. O aumento do stresse oxidativo e a diminuição da capacidade de eliminação destas espécies reactivas por parte das células pode induzir a morte celular por apoptose com alteração concomitante de moléculas envolvidas nesta via apoptótica. Entre estas moléculas encontram-se as proteínas mitocondriais Bax e Bcl2 e o receptor membranar Fas e respectivo ligando FasL [473-475]. Apesar de não existirem diferenças na imunoreactividade das proteínas Bax e Bcl-2 entre neurónios que apresentam tranças neurofibrilares e em neurónios que não apresentam esta característica neuropatológica da DA, sugerindo que estas proteínas não estarão envolvidas na formação destas tranças, a sobre-expressão de Bcl-2 em células da glia reactivas que rodeiam as placas senis sugerem que esta proteína desempenha um papel na sobrevivência destas células. Por outro lado a sobre-expressão de Bax em neurites distróficas de placas senis sugere o envolvimento desta proteína na degeneração das neurites nestas placas [378].

De uma forma geral pode concluir-se que muitos estudos encontraram diferenças entre doentes de Alzheimer, indivíduos com DCL e controlos nos níveis periféricos destes marcadores de stresse oxidativo e de morte celular. Muitos outros falharam nesta mesma tentativa. Apesar disto, existem evidências claras de que estes processos têm um papel activo e central tanto no DCL como na doença de Alzheimer, contribuindo, provavelmente, de uma forma concertada para a ocorrência de morte celular, característica destas patologias (Figura 54).

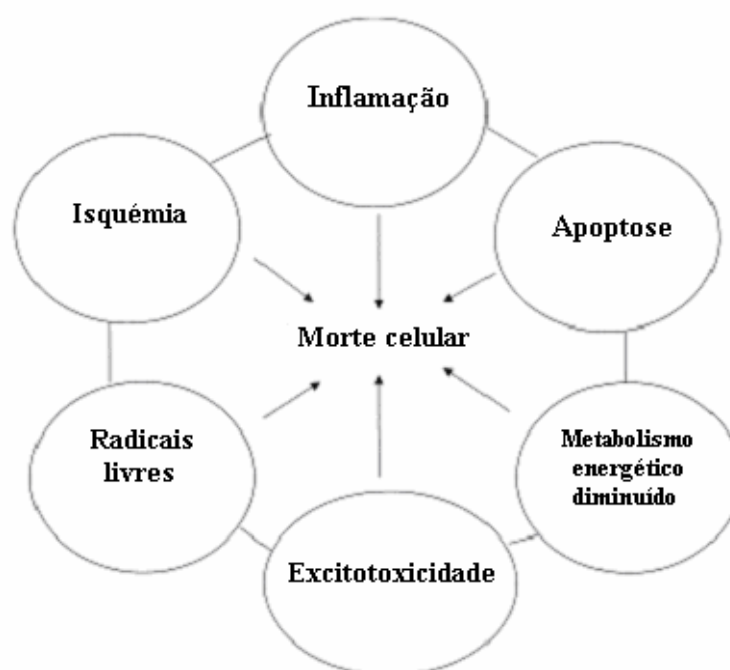


Figura 54. Diferentes mecanismos patogénicos que contribuem para a morte celular na doença de Alzheimer. Adaptado de [267].

Os nossos resultados sugerem que na DA existe um aumento da percentagem de monócitos produtores de citocinas pró-inflamatórias, o que está de acordo com o processo inflamatório persistente existente nesta patologia. Neste contexto, os monócitos poderão ser bons alvos de investigação no estudo da DA e do DCL, enquanto os linfócitos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos, apesar de terem sido considerados como “sondas neuronais” a nível periférico, no estudo de doenças psiquiátricas [476]. Esta diferença entre tipos celulares pode estar relacionada com o facto de os monócitos serem, a nível periférico, as células mais semelhantes à microglia encontrada no sistema nervoso, sendo estas extremamente importantes no metabolismo cerebral. Em condições patológicas, como a DA, são estas células que produzem maior quantidade de interleucinas. A expressão dos diferentes tipos de citocinas estudados a nível dos monócitos sanguíneos revelou a existência de diferenças significativas entre os grupos DA, DCL e controlo. Este facto relaciona-se muito positivamente com a pretensão de encontrar um biomarcador, a nível periférico, para a doença de Alzheimer, capaz de identificar a doença ainda numa fase inicial, ou mesmo de identificar indivíduos em risco para o desenvolvimento de DA. Terá pois todo o interesse a replicação destes resultados

com recurso a uma amostra maior.

De uma forma geral podemos concluir que o decréscimo dos níveis de defesas antioxidantes, principalmente a nível da vitamina E, bem como as evidências da activação do ciclo do glutatião, não só estão patentes a nível periférico nos doentes de Alzheimer, como estão presentes nas fases muito iniciais da doença quando apenas é observável o defeito cognitivo ligeiro. O mesmo pode ser dito relativamente aos parâmetros inflamatórios estudados em monócitos.

Os grupos em estudo revelaram a inexistência de diferenças entre si, no que diz respeito aos parâmetros de morte celular estudados. Provavelmente estas proteínas, a nível periférico, estarão de alguma forma relacionadas com o envelhecimento normal, mas não com o desenvolvimento de DCL e/ou DA.

A nível genético, na população portuguesa, os polimorfismos associados às citocinas estudadas não parecem ser bons indicadores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Verificou-se, no entanto, a associação esperada entre o alelo E4 da ApoE e a doença de Alzheimer.

Podemos assim concluir que dos parâmetros estudados, aqueles relacionados com o stresse oxidativo e com a inflamação se encontram alterados em indivíduos com DCL e DA. Para além disto foi também possível confirmar o facto do DCL ser uma condição que se situa entre o envelhecimento normal e a doença de Alzheimer. Será contudo necessário prosseguir este estudo englobando um maior número de doentes para que alguns dos parâmetros avaliados possam vir a ser considerados como marcadores biológicos destas doenças.

## REFERÊNCIAS

1. Association, A.P., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSMIV*. 4th ed. 1994, Washington, D.C.
2. Hofman, A., et al., *The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings*. Eurodem Prevalence Research Group. Int J Epidemiol, 1991. **20**(3): p. 736-48.
3. Rocca, W.A., et al., *The prevalence of vascular dementia in Europe: facts and fragments from 1980-1990 studies*. EURODEM-Prevalence Research Group. Ann Neurol, 1991. **30**(6): p. 817-24.
4. McKhann, G., et al., *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 939-44.
5. Klatka, L., et al., *Incorrect Diagnosis of Alzheimer's Disease. A Clinicopathological Study*. Arch Neurol, 1996. **53**: p. 35-42.
6. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol (Berl), 1991. **82**(4): p. 239-59.
7. Braak, H. and E. Braak, *[Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia]*. J Hirnforsch, 1991. **32**(3): p. 277-82.
8. Khachaturian, Z.S., *Diagnosis of Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1985. **42**(11): p. 1097-105.
9. Hyman, B.T. and J.Q. Trojanowski, *Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(10): p. 1095-7.
10. Nebes, R.D., D.C. Martin, and L.C. Horn, *Sparing of semantic memory in Alzheimer's disease*. J Abnorm Psychol, 1984. **93**(3): p. 321-30.
11. Nestor, P.G., et al., *Divided attention and metabolic brain dysfunction in mild dementia of the Alzheimer's type*. Neuropsychologia, 1991. **29**(5): p. 379-87.
12. Mortimer, J.A., et al., *Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease*. Neurology, 1992. **42**(9): p. 1689-96.
13. Faber-Langendoen, K., et al., *Aphasia in Senile Dementia of the Alzheimer Type*. Ann Neurol, 1988. **23**: p. 365-70.
14. Bayles, K. and A. Kazniak, *Communication and cognition in normal aging and dementia*, ed. T. Francis. 1987, London.



15. Cummings, J.L., et al., *Depressive symptoms in Alzheimer disease: assessment and determinants*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1995. **9**(2): p. 87-93.
16. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: a central role for amyloid*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(5): p. 438-47.
17. Hardy, J., *The Alzheimer's Disease Research Group. Molecular pathology of Alzheimer's disease*. Lancet, 1991. **1**: p. 1342-1343.
18. Weidemann, A., et al., *Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein*. Cell, 1989. **57**(1): p. 115-26.
19. LeBlanc, A.C., R. Xue, and P. Gambetti, *Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia*. J Neurochem, 1996. **66**(6): p. 2300-10.
20. Banati, R.B., et al., *Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia*. Glia, 1993. **9**(3): p. 199-210.
21. Lewis, D.A., et al., *Distribution of precursor amyloid-beta-protein messenger RNA in human cerebral cortex: relationship to neurofibrillary tangles and neuritic plaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1691-5.
22. Bahmanyar, S., et al., *Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease*. Science, 1987. **237**(4810): p. 77-80.
23. Da Cruz e Silva, O., et al., *Regulated cleavage of Alzheimer B-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail*. Neuroscience, 1993. **57**(4): p. 873-877.
24. Gandy, S., et al., *Protein phosphorylation regulates relative utilization of processing pathways for Alzheimer B/A4 amyloid precursor protein*. Ann New York Acad Sci, 1993. **695**: p. 117-121.
25. Da Cruz e Silva, E., et al., *Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein*. Mol Med, 1995. **1**(5).
26. Konig, G., et al., *Alternative splicing of the beta A4 amyloid gene of Alzheimer's disease in cortex of control and Alzheimer's disease patients*. Brain Res Mol Brain Res, 1991. **9**(3): p. 259-62.
27. Busciglio, J., et al., *Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2092-6.
28. Haass, C., et al., *Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **695**: p. 109-16.

29. Estus, S., T.E. Golde, and S.G. Younkin, *Normal processing of the Alzheimer's disease amyloid beta protein precursor generates potentially amyloidogenic carboxyl-terminal derivatives*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **674**: p. 138-48.
30. Haass, C., et al., *Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments*. Nature, 1992. **357**(6378): p. 500-3.
31. Haass, C., et al., *beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3021-4.
32. Wisniewski, H.M., et al., *Ultrastructural studies of the cells forming amyloid in the cortical vessel wall in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol (Berl), 1992. **84**(2): p. 117-27.
33. Gravina, S.A., et al., *Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43)*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7013-6.
34. Fukumoto, H., et al., *Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 259-65.
35. Scorer, C.A., *Preclinical and clinical challenges in the development of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease*. Drug Discov Today, 2001. **6**(23): p. 1207-1219.
36. Cleveland, D., S. Hwo, and M. Kirschner, *Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly*. J Mol Biol, 1977. **116**: p. 207-225.
37. Köpke, E., et al., *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 24374-24384.
38. Alonso, A., et al., *Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease*. PNAS, 1994. **91**: p. 5562-5566.
39. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology*. PNAS, 1986. **83**: p. 4913-4917.
40. Spillantini, M. and M. Goedert, *Tau protein pathology in neurodegenerative diseases*. Trends Neurosci, 1998. **21**: p. 428-433.
41. Mirra, S., et al., *The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurology, 1991. **41**: p. 479-486.
42. Trojanowski, J., et al., *Vulnerability of the neuronal cytoskeleton in aging and Alzheimer's disease: widespread involvement of all three major filament systems*. Ann Rev Gerontol Geriatr, 1990. **10**: p. 167-82.

43. Kemper, T., *Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and dementia*. 2nd ed. geriatric neurology, ed. O.U. Press. 1994, New York. 3-67.
44. Mirra, S.S., et al., *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurology, 1991. **41**(4): p. 479-86.
45. Mirra, S., M. Gearing, and F. Nash, *Neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurology, 1997. **49**(Suppl3): p. 14-6.
46. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
47. Terry, R. and R. Katzman, *Senile dementia of the Alzheimer type*. Ann Neurol, 1983. **14**: p. 497-506.
48. Tomlinson, B., G. Blessed, and M. Roth, *Observations on the brain of non-demented old people*. Journal of the Neurological Sciences, 1968. **7**: p. 331-56.
49. Berg, L., et al., *Neuropathological indexes in demented and nondemented persons aged 80 or older*. Arch Neurol, 1993. **52**: p. 594-600.
50. Bierer, L., et al., *Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1995. **52**: p. 81-8.
51. Hyman, B., G. vanHoesen, and A. Damasio, *Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: An anatomic study*. Neurology, 1990. **40**: p. 1721-30.
52. Hubbard, B., G. Featon, and J. Anderson, *A quantitative histological study of early clinical and preclinical Alzheimer's disease*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1990. **16**: p. 111-21.
53. Haugh, H., et al., *Anatomical changes in ageing brain*. Aging Clin Exp Res, 1983. **21**: p. 1-12.
54. Coffey, C., et al., *Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain: a cross-sectional study using magnetic resonance imaging*. Neurology, 1992. **42**: p. 527-36.
55. Cowell, P., et al., *Sex differences in aging of the human frontal and temporal lobes*. J Neurosci, 1994. **14**: p. 4748-55.
56. Neary, D., et al., *Alzheimer's disease: a correlative study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1986. **49**: p. 229-37.
57. Gomez-Isla, T., et al., *Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons in very mild Alzheimer's disease*. J Neurosci, 1996. **16**: p. 4491-500.
58. Masliah, E., et al., *Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal*

- aging. *Neurology*, 1993. **43**: p. 192-7.
59. Gibson, P., *EM study of the number of cortical synapses in the brains of ageing people and people with Alzheimer-type dementia*. *Acta Neuropathol*, 1983. **62**: p. 127-33.
60. DeKosky, S. and S. Scheff, *Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity*. *Ann Neurol*, 1990. **27**: p. 457-64.
61. Terry, R., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. *Ann Neurol*, 1991. **30**: p. 572-80.
62. Morris, J.C., et al., *Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 2001. **58**(3): p. 397-405.
63. Petersen, R.C., et al., *Current concepts in mild cognitive impairment*. *Arch Neurol*, 2001. **58**(12): p. 1985-92.
64. Petersen, R., et al., *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome*. *Arch Neurol*, 1999. **56**: p. 303-308.
65. Almkvist, O., et al., *Mild cognitive impairment--an early stage of Alzheimer's disease?* *J Neural Transm Suppl*, 1998. **54**: p. 21-9.
66. Chen, P., et al., *Patterns of cognitive decline in presymptomatic Alzheimer disease: a prospective community study*. *Arch Gen Psychiatry*, 2001. **58**(9): p. 853-8.
67. Petersen, R.C., et al., *Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. *Neurology*, 2001. **56**(9): p. 1133-42.
68. Palmer, K., et al., *Detection of Alzheimer's disease and dementia in the preclinical phase: population based cohort study*. *Bmj*, 2003. **326**(7383): p. 245.
69. Bennett, D.A., *Update on mild cognitive impairment*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2003. **3**(5): p. 379-84.
70. Frisoni, G.B., A. Padovani, and L.O. Wahlund, *The diagnosis of Alzheimer disease before it is Alzheimer dementia*. *Arch Neurol*, 2003. **60**(7): p. 1023; author reply 1023-4.
71. Hanninen, T., et al., *A follow-up study of age-associated memory impairment: neuropsychological predictors of dementia*. *J Am Geriatr Soc*, 1995. **43**(9): p. 1007-15.
72. Hughes, C.P., et al., *A new clinical scale for the staging of dementia*. *Br J Psychiatry*, 1982. **140**: p. 566-72.
73. Santana, I., *O Defeito Cognitivo Ligeiro: Entre o envelhecimento e a demência*. *Psychologica*, 2003. **34**: p. 99-115.

74. Crook, T., H. Bahar, and A. Sudilovsky, *Age-associated memory impairment: diagnostic criteria and treatment strategies*. Int J Neurol, 1987. **21-22**: p. 73-82.
75. Koivisto, K., et al., *Prevalence of age-associated memory impairment in a randomly selected population from eastern Finland*. Neurology, 1995. **45**(4): p. 741-7.
76. Brayne, C. and P. Calloway, *Normal ageing, impaired cognitive function, and senile dementia of the Alzheimer's type: a continuum?* Lancet, 1988. **1**(8597): p. 1265-7.
77. Bartres-Faz, D., et al., *Neuropsychological and genetic differences between age-associated memory impairment and mild cognitive impairment entities*. J Am Geriatr Soc, 2001. **49**(7): p. 985-90.
78. Golomb, J., et al., *Hippocampal formation size in normal human aging: a correlate of delayed secondary memory performance*. Learn Mem, 1994. **1**(1): p. 45-54.
79. Laakso, M.P., et al., *MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects*. Neurobiol Aging, 1998. **19**(1): p. 23-31.
80. Levy, R., *Aging-associated cognitive decline. Working Party of the International Psychogeriatric Association in collaboration with the World Health Organization*. Int Psychogeriatr, 1994. **6**(1): p. 63-8.
81. Ritchie, K., S. Artero, and J. Touchon, *Classification criteria for mild cognitive impairment: a population-based validation study*. Neurology, 2001. **56**(1): p. 37-42.
82. Palmer, K., et al., *Differential evolution of cognitive impairment in nondemented older persons: results from the Kungsholmen Project*. Am J Psychiatry, 2002. **159**(3): p. 436-42.
83. Hogan, D.B. and E.M. Ebly, *Predicting who will develop dementia in a cohort of Canadian seniors*. Can J Neurol Sci, 2000. **27**(1): p. 18-24.
84. Daly, E., et al., *Predicting conversion to Alzheimer disease using standardized clinical information*. Arch Neurol, 2000. **57**(5): p. 675-80.
85. Devanand, D.P., et al., *Questionable dementia: clinical course and predictors of outcome*. J Am Geriatr Soc, 1997. **45**(3): p. 321-8.
86. Small, B.J., et al., *The course of cognitive impairment in preclinical Alzheimer disease: three- and 6-year follow-up of a population-based sample*. Arch Neurol, 2000. **57**(6): p. 839-44.
87. Celsis, P., *Age-related cognitive decline, mild cognitive impairment or preclinical Alzheimer's disease?* Ann Med, 2000. **32**(1): p. 6-14.
88. Fabrigoule, C., et al., *Cognitive process in preclinical phase of dementia*. Brain, 1998. **121** ( Pt 1): p. 135-41.

89. Small, B.J., M. Viitanen, and L. Backman, *Mini-Mental State Examination item scores as predictors of Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1997. **52**(5): p. M299-304.
90. Tierney, M.C., et al., *Prediction of probable Alzheimer disease in patients with symptoms suggestive of memory impairment. Value of the Mini-Mental State Examination*. Arch Fam Med, 2000. **9**(6): p. 527-32.
91. Price, J.L. and J.C. Morris, *Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1999. **45**(3): p. 358-68.
92. Morris, H.R., A.J. Lees, and N.W. Wood, *Neurofibrillary tangle parkinsonian disorders--tau pathology and tau genetics*. Mov Disord, 1999. **14**(5): p. 731-6.
93. Morris, J.C., et al., *Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease*. Neurology, 1996. **46**(3): p. 707-19.
94. McGeer, P., M. Schulzer, and E. McGeer, *Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies*. Neurology, 1996. **47**: p. 425-432.
95. Combs, C., et al., *Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists*. J Neurosci, 2000. **20**: p. 558-567.
96. Davis, E., T. Foster, and W. Thomas, *Cellular forms and functions of brain microglia*. Brain Res Bull, 1994. **34**: p. 73-78.
97. Elkabes, S., E. DiCicco-Bloom, and I. Black, *Brain Microglia/Macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function*. J Neurosci, 1996. **16**: p. 2508-2521.
98. Paresce, D., H. Chung, and F. Maxfield, *Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells*. J Biol Chem, 1998. **272**: p. 29390-29397.
99. DeWitt, D., et al., *Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 1998. **149**: p. 329-340.
100. Araujo, D. and C. Cotman,  *$\beta$ -amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease*. Brain Res, 1992. **569**: p. 141-147.
101. Meda, L., et al., *Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid protein and interferon-g*. Nature, 1995. **374**: p. 647-650.
102. Brown, D., B. Schmidt, and H. Kretschmar, *Role of microglia and host prion protein in*

- neurotoxicity of a prion protein fragment*. Nature, 1996. **380**: p. 345-347.
103. Akiyama, H., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(3): p. 383-421.
104. Fredrickson, R., *Astroglia in Alzheimer's disease*. Neurobiol ageing, 1992. **13**: p. 239-253.
105. Norenberg, M., *Astrocyte responses to CNS injury*. J Neuropath Exp Neurol, 1994. **53**(3): p. 213-220.
106. Neary, J., et al., *Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures*. Acta Neuropathol, 1994. **87**: p. 8-13.
107. Bodjarian, N., et al., *Strong expression of GFAP mRNA in rat hippocampus after a closed-head injury*. NeuroReport, 1997. **8**: p. 3951-3956.
108. Hansen, L., D. Armstrong, and R. Terry, *An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex*. Neurobiology of Aging, 1987. **8**: p. 1-6.
109. Beach, T., R. Walker, and E. McGeer, *Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum*. Glia, 1989. **2**: p. 420-426.
110. Arnold, S., et al., *Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia*. Acta Neuropathol, 1996. **91**: p. 269-277.
111. Brun, A., X. Liu, and C. Erikson, *Synapse loss and gliosis in the molecular layer of the cerebral cortex in Alzheimer's disease and in frontal lobe degeneration*. Neurodeg, 1995. **44**: p. 171-177.
112. Janss, A., et al., *Glial differentiation predicts poor clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors*. Ann Neurol, 1996. **39**: p. 481-489.
113. Miyazono, M., et al., *Widespread distribution of tau in the astrocytic elements of glial tumors*. Acta Neuropathol, 1993. **86**: p. 236-241.
114. Biernat, W., et al., *Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry in astrocytes in experimental Creutzfeldt-Jakob disease and in human kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome*. Neurodegeneration, 1995. **4**: p. 195-201.
115. Dickson, D., et al., *Alzheimer's disease: A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques*. Am J Pathol, 1988. **132**: p. 86-101.
116. Renkawek, K., et al., *Expression of  $\alpha$ -crystalline in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 1994. **87**: p. 155-160.
117. Kato, S., et al., *Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque*

- morphology and relationship between senile plaques and astrocytes*. *Pathol Internat*, 1998. **48**: p. 332-340.
118. Harpin, M., et al., *Glial fibrillary acidic protein and beta A4 protein deposits in temporal lobe of aging brain and senile dementia of the Alzheimer type: relation with the cognitive state and with quantitative studies of senile plaques and neurofibrillary tangles*. *J Neurosci Res*, 1990. **27**: p. 587-594.
  119. Gitter, B., et al., *Amyloid  $\beta$  peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 $\beta$ -activated human astrocytoma cells*. *PNAS*, 1995. **92**: p. 10738-10741.
  120. Forloni, G., et al., *Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion by LPS in astrocytes but not in microglia*. *Cytokine*, 1997. **9**(10): p. 759-62.
  121. Hu, J., et al., *Amyloid- $\beta$  peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release*. *Brain Res*, 1998. **785**: p. 195-206.
  122. Vesce, S., P. Bezzi, and A. Volterra, *The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function*. *Sci Prog*, 1999. **82**(3): p. 251-270.
  123. Rosenberg, P. and E. Aizenman, *Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex*. *Neurosci Lett*, 1989. **103**: p. 162-168.
  124. del Rio-Hortega, P., *Art and artifice in the science of histology*. *Histopathol*, 1933. **22**: p. 515-25.
  125. Gehrman, J. and R. Banati, *Microglial turnover in the injured CNS: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury*. *J Neuropath Exp Neurol*, 1995. **54**: p. 680-688.
  126. Kim, S. and J. Vellis, *Microglia in health and disease*. *J Neurosci Res*, 2005. **in press**.
  127. McGeer, P., et al., *Microglia in degenerative disease*. *Glia*, 1993. **7**: p. 84-92.
  128. Akiyama, H. and P. McGeer, *Brain microglia constitutively express  $\beta$ -integrins*. *J Neuroimmunol*, 1990. **30**: p. 81-93.
  129. Mrak, R., J. Sheng, and W. Griffin, *Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications*. *Hum Pathol*, 1995. **26**: p. 816-823.
  130. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. *PNAS USA*, 1989. **86**: p. 7611-7615.
  131. Griffin, W.S., et al., *Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution*. *J Neuropath*, 1995. **54**: p. 276-281.
  132. Grilli, M., et al., *Interleukin-1 $\beta$  and glutamate activate the NF- $\kappa$ B/Rel binding site from*



- the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. J Biol Chem*, 1996. **271**: p. 15002-15007.
133. Rogers, J., et al., *Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. J Biol Chem*, 1999. **274**: p. 6421-6431.
  134. Yang, Y., w. Quitschke, and e. al., *Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid but not reactive oxygen species. Mol Brain Res*, 1998. **60**: p. 40-49.
  135. Sheng, J.G., et al., *Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. Exp Neurol*, 2000. **163**: p. 388-391.
  136. Li, Y., et al., *Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. J Neurosci*, 2000. **20**: p. 149-155.
  137. Hirano, T., K. Nakajima, and M. Hibi, *Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. Cytokine Growth Factor Rev*, 1997. **8**: p. 241-52.
  138. Saito, T., et al., *Preparation of soluble murine IL-6 receptor and anti-murine IL-6 receptor antibodies. J Immunol*, 1991. **147**: p. 168-73.
  139. Vallieres, L. and S. Rivest, *Regulation of the genes encoding IL-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine IL-1beta. J Neurochem*, 1997. **69**: p. 1668-83.
  140. Frei, K., et al., *On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Eur J Immunol*, 1989. **19**: p. 689-94.
  141. Van Wagoner, N., et al., *IL-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. J Neurosci*, 1999. **19**: p. 5236-44.
  142. Murphy, P., et al., *IL-6 promotes survival of sensory neurons. Neuroscience*, 1997. **23**: p. 890.
  143. Heyser, C., et al., *Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice overexpressing interleukin 6 in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**: p. 1500-5.
  144. Zhong, J., et al., *Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in IL-6-deficient mice. J Neurosci*, 1999. **19**: p. 4305-13.
  145. Bauer, J., et al., *IL-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. FEBS Lett*, 1991. **285**: p. 111-4.
  146. Scheloske, M., et al., *Expression of the IL-6 receptor complex (IL-6RC) in human rapid*

- autopsy tissue*. Neuroscience, 1999. **25**: p. 1536.
147. Murray, R., et al., *Polymorphisms of the IL-6 gene are associated with bone mineral density*. Bone, 1997. **21**: p. 89–92.
  148. Papassotiropoulos, A., C. Hock, and R.M. Nitsch, *Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(6): p. 863–71.
  149. Vandenabeele, P. and W. Fiers, *Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1/IL-6 mediated 'acute phase' response in the brain*. Immunol Today, 1991. **12**: p. 217–9.
  150. Fillit, H., et al., *Elevated circulating TNF levels in Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 1991. **129**: p. 318–20.
  151. Tarkowski, E., et al., *Intracerebral production of TNF-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia*. J Clin Immunol, 1999. **19**: p. 223–30.
  152. Mullberg, J., et al., *A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor*. J Immunol, 1995. **155**: p. 5198–5205.
  153. Antel, J., B. Becher, and T. Owens, *Immunotherapy for multiple sclerosis: from theory to practice [comment]*. Nat Med, 1996. **2**: p. 1074–5.
  154. Perry, V.H., *The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease*. Brain Behav Immun, 2004. **18**(5): p. 407–13.
  155. Markesbery, W. and J. Carney, *Oxidative alterations in Alzheimer's disease*. Brain Pathol, 1999. **9**: p. 133–146.
  156. Barger, S. and A. Harmon, *Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E*. Nature, 1997. **388**: p. 878–81.
  157. Barger, S., et al., *TNFs alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 9328–32.
  158. Bruce, A., et al., *Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors*. Nat Med, 1996. **2**: p. 788–94.
  159. Bruce-Keller, A., et al., *Anti-death properties of TNF against metabolic poisoning: mitochondrial stabilization by MnSOD*. J Neuroimmunol, 1999. **93**: p. 53–71.
  160. Feuerstein, G., T. Liu, and F. Barone, *Cytokines, inflammation, and brain injury: role of TNF-alpha*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1994. **6**: p. 341–60.
  161. Mattson, M., et al., *Brain injury and TNFs induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response*. J Neurosci Res, 1995. **42**: p. 357–70.

162. Buckwalter, M.S. and T. Wyss-Coray, *Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo*. J Neuroinflammation, 2004. **1**(1): p. 10.
163. Carswell, E., et al., *n endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci USA, 1975. **72**(3666–70).
164. Perry, R.T., et al., *The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(6): p. 873-83.
165. McKee, A., et al., *The neurotoxicity of amyloid beta protein in aged primates*. Amyloid, 1998. **5**: p. 1–9.
166. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 641-4.
167. Merberg, D., S. Wolf, and S. Clark, *Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family*. Immunol Today, 1992. **13**(2): p. 77–8.
168. Gubler, U., *Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**(10): p. 4143–7.
169. Watford, W.T., et al., *The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 361-8.
170. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675–80.
171. Ma, X., *The interleukin-12 p40 gene promoter is primed by interferon-g in monocytic cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 147–57.
172. Hale, A., et al., *Apoptosis: molecular regulation of cell death*. Eur J Biochem, 1996. **236**: p. 1-26.
173. Bosman, F., B. Visser, and J. van Oeveren, *Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death*. Pathol Res Pract, 1996. **192**: p. 676-683.
174. Lesort, M., et al., *NMDA induces apoptosis and necrosis in neuronal cultures. Increased APP immunoreactivity is linked to apoptotic cells*. Neurosci Lett, 1997. **221**: p. 213-216.
175. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**: p. 493-501.
176. van Lookeren Campagne, M., et al., *NMDA and kainate induce internucleosomal DNA cleavage associated with both apoptotic and necrotic cell death in the neonatal rat brain*. Eur Journal Neurosci, 1995. **7**: p. 1627-1640.
177. Bredesen, D., *Neural apoptosis*. Ann Neurol, 1995. **38**: p. 839-851.

178. Anglade, P., et al., *Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging*. *Histol Histopathol*, 1997. **12**: p. 603-610.
179. Braak, H. and E. Braak, *Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with ageing and Alzheimer's disease*. *Prog Brain Res*, 1986. **70**: p. 185-212.
180. Rose, C. and R. Henneberry, *Mechanisms of programmed cell death and their implications for the brain*. *Neurodeg*, 1993. **2**: p. 287-298.
181. Smale, G., et al., *Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease*. *Exp Neurol*, 1995. **133**: p. 225-230.
182. Su, J., et al., *Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease*. *NeuroReport*, 1994. **5**: p. 2529-2533.
183. Loo, D., et al., *Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons*. *PNAS*, 1993. **90**: p. 7951-7955.
184. Stadelmann, C., et al., *Alzheimer's disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability but not apoptosis*. *J Neuropath Exp Neurol*, 1998. **57**: p. 456-464.
185. Paradis, E., et al., *Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons*. *J Neurosci*, 1996. **16**: p. 7533-7539.
186. LeBlanc, A., et al., *Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis and Alzheimer's disease*. *J of Biological Chemistry*, 1999. **274**(33): p. 23426-23436.
187. Jordan, J., M. Galindo, and R. Miller, *Role of calpain- and interleukin-1 $\beta$  converting enzyme-like proteases in the  $\beta$ -amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture*. *J neurochem*, 1997. **68**: p. 1612-1621.
188. Rohn, T.T., et al., *Activation of Caspase-8 in the Alzheimer's Disease Brain*. *Neurobiology of Disease*, 2001. **8**(6): p. 1006-1016.
189. Kiatipattanasakul, W., et al., *Apoptosis in the aged dog brain*. *Acta Neuropathol*, 1996. **92**: p. 242-248.
190. Lassmann, H., et al., *Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ*. *Acta Neuropathol*, 1995. **89**: p. 35-41.
191. Baker, S. and E. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. *Oncogene*, 1998. **17**: p. 3261-3270.
192. Chan, F., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. *Science*, 2000. **288**: p. 2351-2354.

193. Huang, B., et al., *NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain*. Nature, 1996. **384**: p. 638–641.
194. Lambert, C., A.M. Landau, and J. Desbarats, *Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system*. Apoptosis, 2003. **8**(6): p. 551-62.
195. Aspinall, R., J. Carroll, and S. Jiang, *Age-related changes in the absolute number of CD95 positive cells in T cell subsets in the blood*. Exp Gerontol, 1998. **33**(6): p. 581-91.
196. Janeway, C., et al., *Immunobiology: The immune system in health and disease*.
197. Korsmeyer, S.J., *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. Blood, 1992. **80**(4): p. 879-86.
198. Owen-Schaub, L., S. Meterissian, and R. Ford, *Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and non-hematologic origin*. J Immunotherapy, 1993. **14**: p. 234–241.
199. Alderson, M., et al., *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**: p. 2231–2235.
200. Miwa, K., et al., *Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand*. Nat Med, 1998. **4**: p. 1287–1292.
201. Rosenwasser, L., *Biologic activities of IL-1 and its role in human disease*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**: p. 344–350.
202. Bechmann, I., et al., *Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration*. Glia, 2000. **32**(1): p. 25-41.
203. Facchinetti, F., et al., *H(2)O(2) induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: Modulation by cAMP*. J Neurosci Res, 2002. **69**: p. 178-188.
204. Vogt, M., et al., *Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells*. FEBS Lett, 1998. **429**: p. 67–72.
205. Yang, E. and S. Korsmeyer, *Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death*. Blood, 1996. **88**: p. 386-401.
206. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**: p. 1675-1687.
207. Barker, V., et al., *TNFalpha contributes to the death of NGF-dependent neurons during development*. Nat Neurosci, 2001. **4**: p. 1194-1198.
208. Cleary, M., S. Smith, and J. Sklar, *Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a*

- hybrid *bcl-2*/immunoglobulin transcript resulting from the *t*(14;18) translocation. *Cell*, 1986. **47**: p. 19-28.
209. Huang, D. and A. Strasser, *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. *Cell*, 2000. **103**: p. 839-842.
  210. Sorenson, C., *Bcl-2 family members and disease*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004. **1644**: p. 169– 177.
  211. Hsu, Y.T., K.G. Wolter, and R.J. Youle, *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. **94**: p. 3668-3672.
  212. Green, D. and J. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. *Science*, 1998. **281**: p. 1309-1312.
  213. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. *Science*, 1997. **275**: p. 1129-1132.
  214. Kowaltowski, A.J., et al., *Elevation of resting mitochondrial membrane potential of neural cells by cyclosporin A, BAPTA-AM, and bcl-2*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **279**(3): p. C852-9.
  215. Bernardi, P., et al., *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. *Eur J Biochem*, 1999. **264**: p. 687-701.
  216. Budd, S., et al., *Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. **97**: p. 6161-6166.
  217. Martinou, J. and D. Green., *Breaking the mitochondrial barrier*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**: p. 63-67.
  218. Schendel, S., M. Montal, and R. JC., *Bcl-2 family proteins as ion-channels*. *Cell Death Differ*, 1998. **5**: p. 372-380.
  219. Gross, A., et al., *Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis*. *Embo J*, 1998. **17**: p. 3878-3885.
  220. Oltvai, Z., C. Milliman, and S. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. *Cell*, 1993. **74**: p. 609-619.
  221. Lodish, H., et al., *Molecular Cell Biology*. 4 ed. 1999, New York: W. H. Freeman.
  222. Merry, D. and S. Korsmeyer, *Bcl-2 gene family in the nervous system*. *Annu Rev Neurosci*, 1997. **20**: p. 245-267.
  223. Oppenheim, R., *Cell death during development of the nervous system*. *Annu Rev Neurosci*, 1991. **14**: p. 453-501.
  224. Sadoul, R., *Bcl-2 family members in the development and degenerative pathologies of the*

- nervous system*. Cell Death Differ, 1998. **5**: p. 805-815.
225. Johnson, M., et al., *Evidence for involvement of Bax and p53, but not caspases, in radiation-induced cell death of cultured postnatal hippocampal neurons*. J Neurosci Res, 1998. **54**: p. 721-733.
226. Miller, T., et al., *Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death*. J Cell Biol, 1997. **139**: p. 205-217.
227. Feinstein, E., et al., *The death domain: A module shared by proteins with diverse cellular functions*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**: p. 342-344.
228. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-706.
229. Sherrington, R., et al., *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-760.
230. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **18**(269, 5226): p. 973-977.
231. Suzuki, N., et al., *An increased percentage of long amyloid B protein secreted by familial amyloid B protein precursor (BAPP717) mutants*. Science, 1994. **264**: p. 1336-1340.
232. Houlden, H., et al., *ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families*. Am J Med Genet, 1998. **81**(1): p. 117-21.
233. Hendriks, L., et al., *Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the betaamyloid precursor protein gene*. Nat Genet, 1992. **1**(3): p. 218-221.
234. Cras, P., et al., *Presenile Alzheimer dementia characterized by amyloid angiopathy and large amyloid core type senile plaques in the APP 692Ala-Gly mutation*. Acta Neuropathol. (Berl.), 1998. **96**(3): p. 253-260.
235. Crook, R., et al., *A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and "cotton wool plaques" due to deletion of exon 9 of the presenilin 1 gene*. Nature Medicine, 1998. **4**: p. 452-455.
236. Scheuner, D., et al., *Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease*. Nature Medicine, 1996. **2**(8): p. 864-870.
237. Perez-Tur, J., et al., *A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene*. Neuroreport, 1995. **7**: p. 297-301.
238. Hardy, J., *The genetic causes of neurodegenerative diseases*. J Alzheimers Dis, 2001. **3**(1): p.

- 109-116.
239. Steiner, H., et al., *A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(40): p. 28669–28673.
  240. Slooter, A., M. Cruts, and S. Kalmijn, *Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study*. Arch Neurol, 1998. **55**: p. 964-968.
  241. Daw, E., H. Payami, and E. Nemens, *The number of trait loci in late-onset Alzheimer's disease*. Am J Hum Genet, 2000. **66**: p. 196-204.
  242. Shastri, B.S., *SNP alleles in human disease and evolution*. J Hum Genet, 2002. **47**(11): p. 561-6.
  243. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. Gene, 1999. **234**(2): p. 177-86.
  244. McCarthy, J.J. and R. Hilfiker, *The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(5): p. 505-8.
  245. Prince, J., et al., *Lack of replication of association findings in complex disease: an analysis of 15 polymorphisms in prior candidate genes for sporadic Alzheimer's disease*. Eur J Hum Genet, 2001. **9**: p. 437-444.
  246. Strittmatter, W., et al., *Apolipoprotein E: highavidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 1977–1981.
  247. Kuusisto, J., et al., *Association of apolipoprotein E with late-onset Alzheimer's disease: a population-based study*. BMJ, 1994. **309**: p. 636-638.
  248. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. Jama, 1997. **278**(16): p. 1349-56.
  249. Henderson, A.S., et al., *Apolipoprotein E allele epsilon 4, dementia, and cognitive decline in a population sample*. Lancet, 1995. **346**(8987): p. 1387-90.
  250. Hyman, B.T., et al., *Apolipoprotein E and cognitive change in an elderly population*. Ann Neurol, 1996. **40**(1): p. 55-66.
  251. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
  252. Gomez-Isla, T., et al., *Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1996. **39**(1): p. 62-70.



- 253. Talbot, C., et al., *Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2*. Lancet, 1994. **343**(8910): p. 1432-3.
- 254. Pitas, R.E., et al., *Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 1987. **917**(1): p. 148-61.
- 255. Nakai, M., et al., *Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia*. Neurosci Lett, 1996. **211**(1): p. 41-4.
- 256. Poirier, J., *Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease*. Trends Neurosci, 1994. **17**(12): p. 525-30.
- 257. Page, K.J., R.D. Hollister, and B.T. Hyman, *Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: an in situ hybridization study*. Neuroscience, 1998. **85**(4): p. 1161-71.
- 258. Arendt, T., et al., *Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele*. J Neurosci, 1997. **17**(2): p. 516-29.
- 259. Overmyer, M., et al., *Astrogliosis and the ApoE genotype. an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue*. Dement Geriatr Cogn Disord, 1999. **10**(4): p. 252-7.
- 260. Nathan, B.P., et al., *The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 19791-9.
- 261. Ma, J., et al., *Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 92-4.
- 262. Rebeck, G.W., et al., *Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions*. Neuron, 1993. **11**(4): p. 575-80.
- 263. Polvikoski, T., et al., *Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein*. N Engl J Med, 1995. **333**(19): p. 1242-7.
- 264. Dik, M.G., et al., *APOE-epsilon4 is associated with memory decline in cognitively impaired elderly*. Neurology, 2000. **54**(7): p. 1492-7.
- 265. Mayeux, R., et al., *Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*. N Engl J Med, 1998. **338**(8): p. 506-11.
- 266. Markesbery, W.R., *The role of oxidative stress in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 1999. **56**(12): p. 1449-52.
- 267. Pratico, D. and N. Delanty, *Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease*. Am J Med, 2000. **109**(7): p. 577-85.

268. Halliwell, B., *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* Lancet, 1994. **344**: p. 721-724.
269. Lipton, S., *Neuronal protection and destruction by NO*. Cell Death Differ, 1999. **6**: p. 937-942.
270. Esposito, E., et al., *A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes*. Neurobiol Aging, 2002. **23**: p. 719-735.
271. Coyle, J. and P. Puttfarcken, *Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders*. Science, 1993. **262**: p. 689-95.
272. Dringen, R., J.M. Gutterer, and J. Hirrlinger, *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4912-6.
273. Bains, J. and C. Shaw, *Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death*. Brain Res Rev, 1997. **25**(3): p. 335-58.
274. Maier, C. and P. Chan, *Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders*. Neuroscientist, 2002. **8**(4): p. 323-334.
275. Husain, J. and B. Juurlink, *Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species*. Brain Res, 1995. **698**: p. 86-94.
276. Lindnau, J., et al., *Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS*. Glia, 2000. **29**: p. 25-34.
277. Bowling, A. and N. Beal, *Bioenergetic and oxidative stress in Neurodegenerative diseases*. Life Sci, 1995. **56**: p. 1151-71.
278. Delacourte, A., et al., *Preferential localization of copper zinc superoxide dismutase in the vulnerable cortical neurons in Alzheimer's Disease*. Neurosci Lett, 1988. **92**: p. 247-53.
279. Cao, C., Y. Leng, and D. Kufe, *Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29667-75.
280. Jeandel, C., et al., *Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's Disease*. Gerontology, 1989. **35**: p. 275-82.
281. Bourdel-Marchasson, I., et al., *Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients*. Age Ageing, 2001. **30**(3): p. 235-41.
282. Zaman, Z., et al., *Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease*. Age and Ageing, 1992. **21**: p. 91-94.
283. Behl, C., et al., *Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity*. Biochem

- Biophys Res Commun, 1992. **186**: p. 944-50.
284. Niki, E. and N. Noguchi, *Dynamics of antioxidant action of vitamin E*. Acc Chem Res, 2004. **37**(1).
285. Vertuani, S., A. Angusti, and S. Manfredini, *The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1677-94.
286. Rice, M., *Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the rat brain*. Trends Neurosci, 2000. **23**: p. 209-16.
287. Hooper, D., *Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**: p. 675-680.
288. Bamberger, M.E. and G.E. Landreth, *Microglial interaction with beta-amyloid: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Microsc Res Tech, 2001. **54**(2): p. 59-70.
289. Clippingdale, A.B., J.D. Wade, and C.J. Barrow, *The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease*. J Pept Sci, 2001. **7**(5): p. 227-49.
290. Paradisi, S., et al., *Astrocyte modulation of in vitro beta-amyloid neurotoxicity*. Glia, 2004. **46**(3): p. 252-60.
291. Gouras, G.K., *Current theories for the molecular and cellular pathogenesis of Alzheimers disease*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-11.
292. Avrutskaya, A.V. and S.A. Leadon, *Measurement of oxidative DNA damage and repair in specific DNA sequences*. Methods, 2000. **22**(2): p. 127-34.
293. Lovell, M., C. Xie, and W. Markesbery, *Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease*. Neurology, 1998. **51**: p. 1562-1566.
294. Bruce-Keller, A., Y. Li, and M. Lovell, *4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**: p. 257-267.
295. Lovell, M., et al., *Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease*. Neurology, 1995. **45**: p. 1594-1601.
296. Delibas, N., R. Ozcankaya, and I. Altuntas, *Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval*. Clin Biochem, 2002. **35**(2): p. 137-41.
297. Smith, M., L. Sayre, and G. Perry, *Morphological aspects of oxidative damage in Alzheimer's disease*. Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases, ed. H.N. Beal MF, Bodis-Wollner. 1997, New York: Wiley-Liss. 335-342.

298. Gabbita, S., M. Lovell, and W. Markesbery, *Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 1998. **71**: p. 2034-040.
299. Wu, L., et al., *Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics*. Clin Chim Acta, 2004. **339**(1-2): p. 1-9.
300. L., B., *Clinical dementia rating (CDR)*. Psychopharmacol Bull, 1988. **24**: p. 637-639.
301. Hissin, P. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Analytical Biochemistry, 1976. **74**: p. 214-226.
302. Guntherberg, H. and J. Rost, *The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods*. Anal Biochem, 1966. **15**(2): p. 205-10.
303. Milne, D. and J. Botnen, *Retinol,  $\alpha$ -tocopherol, lycopene and  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography*. Clin Chem, 1986. **32**(5): p. 874-876.
304. Zaman, Z., P. Fielden, and P. Frost, *Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reverse-phase HPLC in elderly and younger subjects*. Clin Chem, 1993. **39**(11): p. 2229-2234.
305. Burton, G., A. Webb, and K. Ingold, *A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios*. Lipids, 1985. **20**(1): p. 29-39.
306. Wendel, A., *Glutathione Peroxidase in Methods*. Enzymology. Vol. 77. 1981. 325-333.
307. Goldberg, D. and S. Richard, *Glutathione reductase*. Methods of Enzymatic Analysis, ed. B. HO. Vol. 3. 1983. 258-265.
308. Knight, J.A., R.K. Pieper, and L. McClellan, *Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation*. Clin Chem, 1988. **34**(12): p. 2433-8.
309. Knight, J.A., et al., *Reference intervals for plasma lipoperoxides: age-, sex-, and specimen-related variations*. Clin Chem, 1987. **33**(12): p. 2289-91.
310. Draper, H.H. and M. Hadley, *A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde*. Xenobiotica, 1990. **20**(9): p. 901-7.
311. Wong, S.H., et al., *Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct*. Clin Chem, 1987. **33**(2 Pt 1): p. 214-20.
312. Reznick, A.Z. and L. Packer, *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 357-63.
313. Shapiro, H., *Practical Flow Cytometry*. Third ed. 1995, New York: Wiley-Liss.
314. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**: p. 495-497.

- 315. Biosciences, B., *Technical Resources BD Immuncytometry Systems*, B.I. Systems, Editor. 2000.
- 316. Carter, N. and E. Meyer, *Introduction to the principles of flow cytometry*, in *Flow cytometry, a practical approach*, M. Ormerod, Editor. 1990, Oxford University Press: Oxford.
- 317. Valet, G., *Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective*. J Biol Regul Homeost Agents, 2003. **17**: p. 213-22.
- 318. Jacobberger, J., D. Foglemen, and J. Lehman, *Analysis on intracellular antigens by flow cytometry*. Cytometry, 1986. **3**: p. 356-364.
- 319. Sander, B., J. Andersson, and U. Andersson, *Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure*. Immunol Rev, 1991. **119**: p. 65-93.
- 320. Jung, T., et al., *Detection of intracellular cytokines by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1993. **159**(1-2): p. 197-207.
- 321. Prussin, C. and D.D. Metcalfe, *Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies*. J Immunol Methods, 1995. **188**(1): p. 117-28.
- 322. Balkwill, F., *Cytokine Cell Biology: a practical approach*. Third ed. Practical Approach. 2000, New York: Oxford University Press.
- 323. Karlsson, A.C., et al., *Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells*. J Immunol Methods, 2003. **283**(1-2): p. 141-53.
- 324. Maino, V.C. and L.J. Picker, *Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression*. Cytometry, 1998. **34**(5): p. 207-15.
- 325. Bueno, C., et al., *Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods*. Cytometry, 2001. **46**(1): p. 33-40.
- 326. Bueno, C., et al., *A new method for detecting TNF-alpha-secreting cells using direct-immunofluorescence surface membrane stainings*. J Immunol Methods, 2002. **264**(1-2): p. 77-87.
- 327. Schuerwegh, A.J., et al., *Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes*. Cytometry, 2001. **46**(3): p. 172-6.
- 328. McNerlan, S., I. Rea, and H. Alexander, *A whole blood method for measurement of intracellular TNF-a, INF-g and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects*. Exp Gerontol, 2002. **37**: p. 227-234.
- 329. Kirk, B.W., et al., *Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex*

- disease. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(15): p. 3295-311.
330. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
  331. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(16): p. 3761-6.
  332. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. *PCR Methods Appl*, 1995. **4**(6): p. 357-62.
  333. Lyamichev, V., M.A. Brow, and J.E. Dahlberg, *Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases*. *Science*, 1993. **260**(5109): p. 778-83.
  334. Afonina, I., et al., *Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(13): p. 2657-60.
  335. Strachan, T. and A. Read, *Human Molecular Genetics*. Second ed. 1999, Oxford: Bios Scientific Publishers.
  336. Hurme, M. and S. Santtila, *IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(8): p. 2598-602.
  337. Hall, M.A., et al., *Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease*. *Genes Immun*, 2000. **1**(3): p. 219-24.
  338. Weisgraber, K., S. Rall, and R. Mahley, *Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms*. *J Biol Chem*, 1981. **256**: p. 9077-9083.
  339. Crook, R., J. Hardy, and K. Duff, *Single-day apolipoprotein E genotyping*. *J Neurosci Methods*, 1994. **53**(2): p. 125-7.
  340. Henderson, J.N., et al., *Apolipoprotein E4 and tau allele frequencies among Choctaw Indians*. *Neurosci Lett*, 2002. **324**(1): p. 77-9.
  341. Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier, *Arlequin :A software for population genetics data analysis*. 2000, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland: Geneva.
  342. Teunissen, C.E., et al., *Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid*. *Neurobiol Aging*, 2002. **23**(4): p. 485-508.
  343. Jellinger, K. and C. Bancher, *Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update*. *J Neural Transm Suppl*, 1998. **54**: p. 77-95.

- 344. Davis, D., et al., *Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**: p. 376–88.
- 345. Heinonen, O., et al., *beta-Amyloid protein immunoreactivity in skin is not a reliable marker of Alzheimer's disease. An autopsy-controlled study*. Arch Neurol, 1994. **51**(8): p. 799-804.
- 346. Bosman, G.J., et al., *Erythrocyte membrane characteristics indicate abnormal cellular aging in patients with Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1991. **12**(1): p. 13-8.
- 347. Lindner, M.D., et al., *Increased levels of truncated nerve growth factor receptor in urine of mildly demented patients with Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1993. **50**(10): p. 1054-60.
- 348. Pirttila, T., S. Mattinen, and H. Frey, *The decrease of CD8-positive lymphocytes in Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 1992. **107**(2): p. 160-5.
- 349. Bonafe, J.L., et al., *Abnormal hair samples from patients with Alzheimer disease*. Arch Dermatol, 1998. **134**(10): p. 1300.
- 350. Ghanbari, H., et al., *Biochemical assay for AD7C-NTP in urine as an Alzheimer's disease marker*. J Clin Lab Anal, 1998. **12**(5): p. 285-8.
- 351. Licastro, F., et al., *Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and [alpha]-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain?* Journal of Neuroimmunology, 2000. **103**(1): p. 97-102.
- 352. Angelis, P., et al., *Serum IL-6, and IL-6 soluble receptor in Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 1998. **244**: p. 106–8.
- 353. Pirttila, T., et al., *Alpha 1-antichymotrypsin, and IL-1 beta are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1994. **15**: p. 313–7.
- 354. Neale, B.M. and P.C. Sham, *The future of association studies: gene-based analysis and replication*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(3): p. 353-62.
- 355. Xu, J., et al., *Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?* Hum Genet, 2002. **111**(6): p. 573-4.
- 356. Heun, R., *Does gender play a role in Alzheimer therapy?* Expert Rev Neurotherapeutics, 2002. **2**(5): p. 589-591.
- 357. van Duijn, C.M. and A. Hofman, *Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease*. Bmj, 1991. **302**(6791): p. 1491-4.
- 358. van Duijn, C.M., T. Stijnen, and A. Hofman, *Risk factors for Alzheimer's disease: overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group*. Int J Epidemiol, 1991. **20 Suppl 2**: p. S4-12.

359. Kivipelto, M., et al., *Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study*. Bmj, 2001. **322**(7300): p. 1447-51.
360. Marchini, J., et al., *The effects of human population structure on large genetic association studies*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 512-7.
361. Llorca, J., et al., *Consistency in gene-Alzheimer's disease association studies*. J Epidemiol Community Health, 2005. **59**(1): p. 83-5.
362. Hasegawa, Y., et al., *Increased soluble TNF receptor levels in the serum of elderly people*. Gerontology, 2000. **46**: p. 185-8.
363. Pietschmann, P., et al., *The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism*. Exp Gerontol, 2003. **38**(10): p. 1119-27.
364. Nguyena, L., et al., *Sex differences in in vitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients*. Journal of Neurol Sci, 2003. **209**: p. 93- 99.
365. De Luigi, A., et al., *Peripheral inflammatory response in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia*. Neurobiol Dis, 2002. **11**(2): p. 308-14.
366. Sala, G., et al., *Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 909-14.
367. Lombardi, V.R., et al., *Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals*. J Neuroimmunol, 1999. **97**(1-2): p. 163-71.
368. Huberman, M., et al., *Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage*. J Neuroimmunol, 1994. **52**: p. 147-52.
369. Lombardi, V., et al., *Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's disease (AD) individuals*. J Neuroimmunol, 1999. **97**(1/2): p. 163-71.
370. De Simoni, M., et al., *Central endotoxin induces different patterns of interleukin (IL)-1B and IL-6 messenger ribonucleic acid expression and IL-6 secretion in the brain and periphery*. Endocrinology, 1995. **136**: p. 897-902.
371. Song, D., et al., *Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice*. J Neurochem, 2001. **76**: p. 1326-35.
372. Delacourte, A., et al., *Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 2002. **59**: p. 398-407.



373. Graff-Radford, N., et al., *Evidence that plasma amyloid beta protein may be useful as a premorbid biomarker for Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(1): p. S384.
374. Tamaoka, A., et al., *Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 1996. **141**(12): p. 65–8.
375. Reale, M., et al., *Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1b and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients*. Exp Gerontol, 2005. **40**: p. 165–171.
376. Yao, Y., et al., *Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis*. Journal of Neuroinflammation, 2004: p. 1-21.
377. de la Monte, S.M., Y.K. Sohn, and J.R. Wands, *Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 1997. **152**(1): p. 73-83.
378. Tortosa, A., E. López, and I. Ferrer, *Bcl-2 and Bax protein expression in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathologica, 1998. **95**(4): p. 407-412.
379. Kitamura, Y., et al., *Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease*. Brain Res, 1998. **780**(2): p. 260-9.
380. Jellinger, K.A. and C. Stadelmann, *Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2001. **3**(1): p. 31-40.
381. Hengartner, M., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**: p. 770-776.
382. Iwai, K., et al., *Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils*. Blood, 1994. **84**(4): p. 1201-8.
383. Akgul, C., D. Moulding, and S. Edwards, *Molecular control of neutrophil apoptosis*. FEBS Lett, 2001. **487**: p. 318–322.
384. Kotani, J., et al., *Fas-mediated neutrophil apoptosis and associated AI protein expression during systemic inflammation are regulated independently of both tumor necrosis factor receptors*. Shock, 2003. **19**(3): p. 201-7.
385. Aggarwal, S., S. Gollapudi, and S. Gupta, *Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2154-61.
386. Aggarwal, S. and S. Gupta, *Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1627-37.
387. Sengun, I.S. and S.H. Appel, *Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis*. J

- Neuroimmunol, 2003. **142**(1-2): p. 137-40.
388. Richartz, E., et al., *Increased serum levels of CD95 in Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2002. **13**(3): p. 178-82.
389. Tanaka, M., et al., *Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated T lymphocytes*. EMBO J, 1995. **14**: p. 1129.
390. Yewa, D., W. Li, and W. Liu, *Fas and activated caspase 8 in normal, Alzheimer and multiple infarct brains*. Neurosci Lett, 2004. **367**: p. 113–117.
391. Su, J.H., et al., *Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death*. Neurobiol Dis, 2003. **12**(3): p. 182-93.
392. Ferrer, I., et al., *Fas and Fas ligand expression in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2001. **102**: p. 121–131.
393. Martinez, M., et al., *Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations*. Brain Res, 2000. **869**(1-2): p. 216-9.
394. Eikelenboom, P., et al., *Neuroinflammation and Alzheimer disease: clinical and therapeutic implications*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2000(14): p. S54–61.
395. Skoog, I., R. Kalaria, and M. Breteler, *Vascular factors and Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1999. **13** (Suppl 3): p. S106–14.
396. Nourhashemi, F., et al., *Alzheimer disease: protective factors*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**: p. 643S–649S.
397. Suzuki, J., Y. Inoue, and S. Suzuki, *Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**: p. 431–6.
398. Polidori, M., et al., *Physical activity and oxidative stress during aging*. Int J Sports Med, 2000. **21**: p. 154–7.
399. Mecocci, P., et al., *Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease*. Arch Neurology, 2002. **59**: p. 794–798.
400. Polidori, M., et al., *Profiles of antioxidants in human plasma*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**: p. 456–462.
401. Mecocci, P., *Oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: A continuum*. J Alz Dis, 2004. **6**: p. 159–163.
402. Praticò, D., et al., *Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: A possible*

- predictor of Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2002. **59**: p. 972–976.
403. Mecocci, P., et al., *Antioxidants for the treatment of mild cognitive impairment*. Neurol Res, 2004. **26**: p. 598–602.
  404. Brigelius-Flohe, R., *Vitamin E and drug metabolism*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 737-40.
  405. Goodman, Y. and M. Mattson, *Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury*. Exp Neurol, 1994. **128**: p. 1–12.
  406. Murphy, T., R. Schnaar, and J. Coyle, *Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake*. FASEB J, 1990. **4**: p. 1624–33.
  407. Ortega, R., et al., *Cognitive function in elderly people is affected by Vitamin E status*. J Nutr, 2002. **132**(7): p. 2065–8.
  408. Sano, M., et al., *A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 1997. **336**: p. 1216–1222.
  409. Rinaldi, P., et al., *Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 915-9.
  410. Foy, C.J., et al., *Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease*. QJM, 1999. **92**(1): p. 39-45.
  411. Polidori, M.C., et al., *Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2004. **18**(3-4): p. 265-70.
  412. Meydani, M., *Vitamin E*. Lancet, 1995. **345**: p. 170–5.
  413. Ramassamy, C., et al., *Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **86**(1-2): p. 76-83.
  414. Ono, K., et al., *Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro*. Experimental Neurology, 2004. **189**(2): p. 380-392.
  415. Butterfield, D.A., C.B. Pocernich, and J. Drake, *Elevated Glutathione as a Therapeutic Strategy in Alzheimer's Disease*. Drug Dev. Res., 2002. **56**: p. 428-437.
  416. Foresti, R., et al., *Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 18411–18417.

417. Calabrese, V., et al., *Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance*. J Neurosci Res, 2000. **60**(5): p. 613-22.
418. Benzi, G. and A. Moretti, *Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system*. Free Radic Biol Med, 1997. **19**: p. 77-101.
419. Aksenov, M., et al., *The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 1998. **11**: p. 151-164.
420. Miranda, S., et al., *The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease*. Prog Neurobiol, 2000. **62**(6): p. 633-48.
421. Kaufmann, J.A., P.C. Bickford, and G. Taglialatela, *Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats*. J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 1099-108.
422. Ceballos, I., et al., *Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type - Place of the extracellular glutathione peroxidase*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(4): p. 579-587.
423. Santos, C.X.C., E.I. Anjos, and O. Augusto, *Uric Acid Oxidation by Peroxynitrite: Multiple Reactions, Free Radical Formation, and Amplification of Lipid Oxidation*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **372**(2): p. 285-294.
424. HOOPER, D.C., et al., *Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis*. FASEB J., 2000. **14**(5): p. 691-698.
425. Hensley, K., et al., *Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation*. J Neurosci, 1998. **18**: p. 8126-8132.
426. Ghiselli, A., et al., *Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **29**(11): p. 1106-1114.
427. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(33): p. 20313-20316.
428. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.
429. Granot, E. and R. Kohen, *Oxidative stress in abetalipoproteinemia patients receiving long-term vitamin E and vitamin A supplementation*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(2): p. 226-30.
430. Butterfield, D. and J. Kanski, *Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative*

- disorders that are associated with aggregated proteins.* Mech Ageing Dev, 2001. **122**: p. 945–962.
431. Jovanovic, S.V., D. Clements, and K. MacLeod, *Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome.* Free Radical Biology and Medicine, 1998. **25**(9): p. 1044-1048.
432. Cecchi, C., et al., *Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients.* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(10): p. 1372-9.
433. Bet, L., et al., *Malondialdehyde production features in platelets of Parkinson and Alzheimer patients and in physiological aging.* NEUROSCIENCE RESEARCH COMMUNICATIONS, 1999. **25**(1): p. 33-41.
434. Beckman, J., et al., *SOD and peroxynitrite.* Nature, 1993. **364**: p. 584.
435. Bolanos, J., et al., *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases.* J. Neurochem, 1997. **68**: p. 2227–2240.
436. Heales, S.J., et al., *Nitric oxide, mitochondria and neurological disease.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1410**(2): p. 215-28.
437. Wei, T., et al., *EPC-K1 attenuates peroxynitrite-induced apoptosis in cerebellar granule cells.* Biochem Mol Biol Int, 1998. **46**: p. 89.
438. Poderoso, J., et al., *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondria particles.* Arch Biochem Biophys, 1996. **328**: p. 85.
439. Gegg, M.E., et al., *Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration?* J Neurochem, 2003. **86**(1): p. 228-37.
440. Wei, T., et al., *Nitric oxide damages neuronal mitochondria and induces apoptosis in neurons.* Chin Scien Bul, 2000. **45**(5): p. 422-426.
441. Smith, M., et al., *Widespread peroxynitrite mediated damage in Alzheimer's disease.* J. Neurosci, 1997. **17**: p. 2653–2657.
442. Kish, S., et al., *Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease.* J. Neurochem, 1992. **59**: p. 776–779.
443. Canevari, L., et al., *Amyloid  $\beta$  peptide inhibits mitochondrial enzymes and function.* J. Neurochem, 2001. **76**(Suppl. 1): p. 30.
444. Casley, C., et al.,  *$\beta$ -Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme*

- activities. *J. Neurochem*, 2002. **80**: p. 91–100.
445. Corregidor, C. and J. Pasamonte, *Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with Alzheimer's disease*. *Acta Neurol Scand*, 1996. **94**: p. 411-414.
  446. Selley, M.L., *Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(7): p. 903-7.
  447. Duncan, A.J. and S.J.R. Heales, *Nitric oxide and neurological disorders*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005. **26**(1-2): p. 67-96.
  448. Nishimura, M., et al., *Influence of polymorphisms in the genes for cytokines and glutathione S-transferase omega on sporadic Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 2004. **368**(2): p. 140-3.
  449. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 2001. **58**(11): p. 1790-2.
  450. Culpan, D., et al., *Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 2003. **350**(1): p. 61-5.
  451. Collins, J.S., et al., *Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative*. *Am J Med Genet*, 2000. **96**(6): p. 823-30.
  452. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
  453. Kaluza, W., et al., *Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNFalpha 238A promoter polymorphism*. *J Invest Dermatol*, 2000. **11**: p. 1180–1183.
  454. Alvarez, V., et al., *Association between the TNFalpha-308 A/G polymorphism and the onset-age of Alzheimer disease*. *Am J Med Genet*, 2002. **114**(5): p. 574-7.
  455. Fishman, D., et al., *The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis*. *J Clin Invest*, 1998. **102**: p. 1369–1376.
  456. Bagli, M., et al., *Polymorphisms of the gene encoding the inflammatory cytokine interleukin-6 determine the magnitude of the increase in soluble interleukin-6 receptor levels in Alzheimer's disease. Results of a pilot study*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2003. **253**(1): p. 44-8.
  457. Bagli, M., et al., *Association between an interleukin-6 promoter and 30 flanking region haplotype and reduced Alzheimer's risk in a German population*. *Neurosci Lett*, 2000(283): p. 109–112.

458. Bhojak, T.J., et al., *Genetic polymorphisms in the cathepsin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2000. **288**(1): p. 21-4.
459. Shibata, N., et al., *Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype-phenotype association study in Japanese cases*. Am J Med Genet, 2002. **114**(4): p. 436-9.
460. Licastro, F., et al., *Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 921-6.
461. Hedley, R., et al., *Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia*. Ann Neurol, 2002. **51**(6): p. 795-7.
462. Nicoll, J., R. Mrak, and D. Graham, *Association of interleukin 1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2000. **47**: p. 365-368.
463. Sciacca, F.L., et al., *Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(7): p. 927-31.
464. Licastro, F., et al., *A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(8): p. 1017-22.
465. Rosenmann, H., et al., *Lack of association of interleukin-1beta polymorphism with Alzheimer's disease in the Jewish population*. Neurosci Lett, 2004. **363**(2): p. 131-3.
466. Craig, D., et al., *The interleukin 1beta gene promoter polymorphism (-511) acts as a risk factor for psychosis in Alzheimer's dementia*. Ann Neurol, 2004. **56**(1): p. 121-4.
467. Grimaldi, L.M., et al., *Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism*. Ann Neurol, 2000. **47**(3): p. 361-5.
468. McCulley, M.C., I.N. Day, and C. Holmes, *Association between interleukin 1-beta promoter (-511) polymorphism and depressive symptoms in Alzheimer's disease*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004. **124**(1): p. 50-3.
469. Blacker, D. and R.E. Tanzi, *The genetics of Alzheimer's disease. Current status and future prospects*. Arch Neurol, 1998. **55**: p. 294-296.
470. Eckert, A., et al., *Enhanced vulnerability to apoptotic cell death in sporadic Alzheimer's disease*. NeuroReport, 1998. **9**: p. 2443- 6.
471. Eckert, A., et al., *Lymphocytes as cell model to study apoptosis in Alzheimer's disease: vulnerability to programmed cell death appears to be altered*. J Neural Transm, 1998. **54**(Suppl): p. 259-67.
472. Eckert, A., et al., *Free intracellular calcium in peripheral cells in Alzheimer's disease*.

- Neurobiol Aging, 1997. **18**: p. 281- 4.
473. Orth, M. and A.H. Schapira, *Mitochondria and degenerative disorders*. Am J Med Genet, 2001. **106**(1): p. 27-36.
474. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
475. Schindowski, K., et al., *Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(5): p. 661-70.
476. Gladkevich, A., H. Kauffman, and J. Korf, *Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders*. Progr Neuro-Psychopharm Biol Psych, 2004. **28**: p. 559– 576.